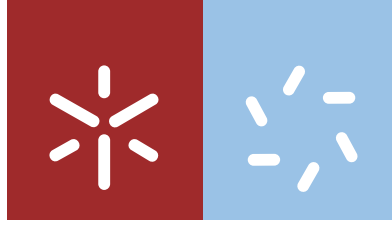


**Universidade do Minho**  
Escola de Ciências

Sofia Raquel Martins Carvalho

**Óleos essenciais para controlo dos fungos  
responsáveis pelas principais doenças  
da videira (*Vitis vinifera*)**

agosto de 2018



**Universidade do Minho**  
Escola de Ciências

Sofia Raquel Martins Carvalho

**Óleos essenciais para controlo dos fungos  
responsáveis pelas principais doenças  
da videira (*Vitis vinifera*)**

Dissertação de Mestrado  
Mestrado em Biologia Molecular, Biotecnologia  
e Bioempreendedorismo em Plantas

Trabalho realizado sob orientação do  
**Professor Doutor Alberto Carlos Pires Dias**  
e do  
**Professor Doutor Armando Albino Dias Venâncio**

## **DECLARAÇÃO**

**Nome:** Sofia Raquel Martins Carvalho

**Endereço eletrónico:** sofia.oak.93@gmail.com

**Telefone:** 914625462

**Número do Bilhete de Identidade:** 14371793

**Título dissertação:** Óleos essenciais para controlo dos fungos responsáveis pelas principais doenças da videira (*Vitis vinifera*)

### **Orientadores:**

Professor Doutor Alberto Carlos Pires Dias

Professor Doutor Armando Albino Dias Venâncio

**Ano de conclusão:** 2018

Mestrado em Biologia Molecular, Biotecnologia e Bioempreendedorismo em Plantas

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA DISSERTAÇÃO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

Universidade do Minho, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_



## Agradecimentos

Aos meus orientadores, professor Alberto Dias e professor Armando Venâncio, agradeço desde já todo o conhecimento transmitido e tempo dispensado para me ajudar neste percurso.

À minha colega de curso e primeira amiga nesta universidade, Bárbara, que esteve sempre a meu lado, pronta para ajudar em tudo, com uma paciência sem limites e capaz de me fazer sorrir em qualquer altura.

Aos meus colegas de laboratório, portugueses e do outro lado do oceano, que me receberam prontamente e sempre se mostraram disponíveis para me ajudar com qualquer problema que surgisse.

À minha amiga mais antiga, Bibas, e ao António. Souberam sempre como me fazer esquecer, nem que fosse por um minuto, todos os problemas e desafios que me foram aparecendo no caminho. Sou mais fabulosa com vocês!

A Coimbra, que já parece tão distante. Ao meu mais velho que está a quase um dia de distância, à minha Tixa que está além Tejo e ao Sandro, o único que ainda posso encontrar na cidade dos estudantes. Sempre me inspiraram a fazer mais e melhor e estão sempre disponíveis à distância de uma chamada. Os amigos de faculdade são mesmo para toda a vida!

Ao André. Se o destino existe, juntou-nos no lugar mais improvável e na altura menos oportuna. Se conseguimos até aqui, nada nos para. Obrigado pela paciência, por todo o apoio, carinho e por me tornares mais feliz.

À minha família. Aos meus pais, à minha bichinha, aos meus avós. Acreditaram desde o primeiro minuto que eu sou capaz (mais do que eu, até) e nunca me deixaram desistir. Para sempre grata por tudo o que sempre fizeram por mim.

“But you know, happiness can be found even in the darkest of times, if one only remembers to turn on the light.”

— J.K. Rowling, *Harry Potter and the Prisoner of Azkaban*









# Óleos essenciais para controlo dos fungos responsáveis pelas principais doenças da videira (*Vitis vinifera*)

## Resumo

A videira (*Vitis vinifera*) é uma espécie com grande importância a nível económico, social e cultural por todo o mundo. Esta sofre ataques por agentes biológicos que põem em risco o seu rendimento e sobrevivência. Um grupo de organismos responsáveis por estes ataques são os fungos filamentosos patogénicos. Atualmente, os processos de controlo antifúngicos mais utilizados recorrem principalmente a fungicidas químicos, que persistem nos solos e no produto final das uvas (o vinho), sendo prejudiciais para o ambiente e saúde humana e de outros seres vivos. Neste trabalho pretendeu-se explorar uma alternativa mais sustentável, recorrendo à aplicação de óleos essenciais (OEs). Três fungos filamentosos que provocam doenças na videira foram testados: *Armillaria mellea*, que provoca a podridão branca; *Botrytis cinerea*, responsável pela podridão cinzenta e *Phaeoemoniella chlamydospora*, agente do complexo da doença de Esca. Avaliou-se o comportamento destes fungos sob o efeito de OEs de plantas, já conhecidos por possuírem características antifúngicas naturais. A experiência consistiu em avaliar *in situ* o crescimento micelar do fungo e depois de perceber se também a germinação de esporos era inibida, quando em contacto com o OE.

*In vitro*, para cada um dos três fungos avaliou-se o crescimento dos micélios quando em contacto com os OEs - *Cinnamomum zeylanicum*, *Cymbopogon nardus*, *Melaleuca alternifolia*, *Thymus mastichina* e *Porophyllum ruderale*. Embora tenham havido algumas variações, o OE que melhor efeito inibidor demonstrou em todos os fungos foi o de *C. zeylanicum*. Depois, esporos de *B. cinerea* foram inoculados com o OE de *C. zeylanicum*, de *P. ruderale*, eugenol (componente maioritário do OE de *C. zeylanicum*) e eugenol encapsulado em micropartículas. Mais uma vez foi o OE de *C. zeylanicum* que conseguiu uma inibição da germinação de 100%, assim como o eugenol encapsulado. Um produto químico, Mekzol, já comercializado para a indústria da cortiça, foi também testado para a inibição do crescimento micelar dos três fungos. Foi utilizado como agente comparativo e não teve efeitos inibitórios, como os OEs.

**Palavras chave:** *Vitis vinifera*, fungos filamentosos patogénicos, antifúngico, óleos essenciais







# Essential oils for the control of fungi responsible for major diseases of the vine (*Vitis vinifera*)

## Abstract

The vine (*Vitis vinifera*) is a plant with great economic, social and cultural importance all over the world. Which suffers attacks by biological agents that put its health at risk. A group of organisms responsible for these attacks are pathogenic filamentous fungi. Currently, the most usual antifungal control process relies on chemical products, which persist in the soil and in the final product of the grapes (the wine), being harmful to the human health and the health of other living creatures. The goal of this research was to explore a sustainable alternative to control three filamentous fungi that cause diseases in the vine: *Armillaria mellea* – White root rot, *Botrytis cinerea* - Grey mold and *Phaeomoniella chlamydospora* - Esca disease complex. The effect of five essential oils (EOs), already known to have natural antifungal characteristics, was tested on these fungi. The experiment consisted in the evaluation of both mycelial growth and spore germination of the fungus when in contact with the EO.

*In vitro*, the mycelial growth of each of the three fungi was evaluated when in contact with EOs - *Cinnamomum zeylanicum*, *Cymbopogon nardus*, *Melaleuca alternifolia*, *Thymus mastichina* and *Porophyllum ruderale*. Even though there were some differences, the EO that best demonstrates the inhibitor effect against all fungi tested was *C. zeylanicum*. Then, *B. cinerea* spores were incubated with EO of *C. zeylanicum* and *P. ruderale*, eugenol (major component of *C. zeylanicum* EO) and eugenol encapsulated in microparticles. Once again it was *C. Zeylanicum* EO that achieved a 100% inhibition of germination, as well as encapsulated eugenol. A chemical product, Mekzol, already marketed to the cork oak industry, was also tested for inhibition of micellar growth of the three fungi. It was used as a comparative and had a completely opposite effect of the EO.

**Key words:** *Vitis vinifera*, pathogenic filamentous fungi, antifungal, essential oils



# Índice

Agradecimentos.....	iii
Resumo .....	v
Abstract.....	vii
Lista de abreviaturas e siglas .....	xi
Índice de figuras.....	xii
Índice de tabelas.....	xiv
<b>1. Introdução e Revisão bibliográfica.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Enquadramento histórico, cultural e económico da videira e do vinho.....</b>	<b>2</b>
<b>1.2. A videira (<i>Vitis vinifera</i> L.) .....</b>	<b>3</b>
<b>1.3. Doenças na videira e os principais organismos responsáveis.....</b>	<b>4</b>
<b>1.4. O reino Fungi.....</b>	<b>4</b>
1.4.1. <i>Armillaria mellea</i> - Podridão radicular .....	6
1.4.2. <i>Botrytis cinerea</i> – Podridão cinzenta (“bunch rot”) .....	7
1.4.3. <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> – Complexo da doença de Petri.....	10
<b>1.5. O uso de fungicidas.....</b>	<b>13</b>
<b>1.6. Óleos essenciais (OE) .....</b>	<b>14</b>
1.6.1. Óleo Essencial de <i>Cinnamomum zeylanicum</i> Blume .....	16
1.6.2. Óleo Essencial de <i>Cymbopogon nardus</i> L.....	17
1.6.3. Óleo Essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i> L.....	18
1.6.4. Óleo Essencial de <i>Thymus mastichina</i> L. ....	19
1.6.5. Óleo Essencial de <i>Porophyllum ruderale</i> Jacq. ....	20
<b>Objetivos.....</b>	<b>22</b>
<b>2. Materiais e Métodos .....</b>	<b>23</b>
<b>2.1. Material biológico.....</b>	<b>24</b>
<b>2.2. Avaliação da atividade antifúngica .....</b>	<b>24</b>
2.2.1. Testes da inibição do crescimento micelar com óleos essenciais.....	24
2.2.2. Testes da inibição do crescimento micelar com Mekzol.....	25
2.2.3. Teste da inibição da germinação de esporos de <i>B. cinerea</i> .....	26
2.2.4. Tratamento de dados e análise estatística.....	28
<b>3. Resultados e discussão .....</b>	<b>29</b>
<b>3.1. Análise química dos óleos essenciais.....</b>	<b>30</b>
<b>3.2. Avaliação da atividade antifúngica .....</b>	<b>32</b>
a) Inibição do crescimento micelar de <i>A. mellea</i> .....	32
b) Inibição do crescimento micelar de <i>B. cinerea</i> .....	38
c) Inibição do crescimento micelar de <i>P. chlamydospora</i> .....	45

3.3. Inibição do crescimento micelar por ação do Mekzol.....	51
3.4. Inibição da germinação de esporos de <i>B. cinerea</i> .....	54
<b>4. Conclusões finais.....</b>	<b>58</b>
<b>Referências bibliográficas.....</b>	<b>62</b>
<b>Bibliografia.....</b>	<b>63</b>



## Lista de abreviaturas e siglas

<b>%</b>	percentagem
<b>a.C.</b>	antes de Cristo
<b>ANOVA</b>	ANalysis Of VAriances
<b>BWS</b>	“brown wood streaking”
<b>CG-MS</b>	cromatografia gasosa acoplada a um espectómetro de massas
<b>CTCOR</b>	Centro Tecnológico de Cortiça
<b>DMI</b>	inibidor de biossíntese de esteróis
<b>GLSD</b>	grapevine leaf-stripe disease
<b>GRAS</b>	generally recognised as safe
<b>INE</b>	Instituto Nacional de Estatística
<b>ISO</b>	Organização Internacional de Normalização
<b>L.</b>	Lineu
<b>MEA</b>	malt extract agar
<b>OE</b>	óleo essencial
<b>OEs</b>	óleos essenciais
<b>PD</b>	“potato dextrose”
<b>PDA</b>	“potato dextrose agar”
<b>Spp</b>	espécie
<b>subsp.</b>	Subespécie

## Índice de figuras

Figura 1 - As 13 regiões vinícolas portuguesas [8]. .....	3
Figura 2 - Doenças da videira provocadas por diferentes organismos [11]. .....	4
Figura 3 - Os filós do reino Fungi: (a-d) Chytridiomycota, (e,f) Zygomycete, (g-i) Ascomycota e (j-l) Basidiomycota [13]. .....	5
Figura 4 - Estrutura química dos componentes maioritários em <i>Cinnamomum zeylanicum</i> [50]. .....	16
Figura 5 - Estrutura química dos constituintes de <i>Cymbopogon nardus</i> [109]. .....	17
Figura 6 - Estrutura química dos constituintes de <i>Melaleuca alternifolia</i> [78]. .....	19
Figura 7 - Estrutura química dos constituintes de <i>Thymus mastichina</i> [110]. .....	20
Figura 8 - Composição química de <i>Porophyllum ruderale</i> [111]. .....	21
Figura 9 - Esquema do método usado para avaliação da inibição do crescimento micelar. ....	25
Figura 10 - Esquema do método usado para avaliação da inibição da germinação de esporos. ....	27
Figura 11 - Crescimento micelar (mm) de <i>A. mellea</i> em contato com OE de <i>C. zeylanicum</i> nas quantidades 2 $\mu$ L, 5 $\mu$ L, 10 $\mu$ L e 25 $\mu$ L ao longo do ensaio. ....	34
Figura 12- Crescimento micelar (mm) de <i>A. mellea</i> em contato com OE de <i>C. nardus</i> nas quantidades 2 $\mu$ L, 5 $\mu$ L, 10 $\mu$ L e 25 $\mu$ L ao longo do ensaio. ....	34
Figura 13- Crescimento micelar (mm) de <i>A. mellea</i> em contato com OE de <i>M. alternifolia</i> nas quantidades 2 $\mu$ L, 5 $\mu$ L, 10 $\mu$ L e 25 $\mu$ L ao longo do ensaio. ....	35
Figura 14 - Crescimento micelar (mm) de <i>A. mellea</i> em contato com OE de <i>T. mastichina</i> nas quantidades 2 $\mu$ L, 5 $\mu$ L, 10 $\mu$ L e 25 $\mu$ L ao longo do ensaio. ....	35
Figura 15 - Crescimento micelar (mm) de <i>A. mellea</i> em contato com OE de <i>P. ruderale</i> nas quantidades 2 $\mu$ L, 5 $\mu$ L, 10 $\mu$ L e 25 $\mu$ L ao longo do ensaio. ....	36
Figura 16 - Percentagem de inibição do crescimento micelar de <i>A. mellea</i> em contato com OE de <i>C. zeylanicum</i> , OE de <i>C. nardus</i> , OE de <i>M. alternifolia</i> , OE de <i>T. mastichina</i> e OE de <i>P. ruderale</i> em diferentes quantidades (2 $\mu$ L, 5 $\mu$ L, 10 $\mu$ L e 25 $\mu$ L) no 13 <sup>o</sup> dia de ensaio. ....	37
Figura 17 - Crescimento micelar (mm) de <i>B. cinerea</i> em contato com OE de <i>C. zeylanicum</i> nas quantidades 2 $\mu$ L, 5 $\mu$ L, 10 $\mu$ L e 25 $\mu$ L ao longo do ensaio. ....	40
Figura 18 - Crescimento micelar (mm) de <i>B. cinerea</i> em contato com OE de <i>C. nardus</i> nas quantidades 2 $\mu$ L, 5 $\mu$ L, 10 $\mu$ L e 25 $\mu$ L ao longo do ensaio. ....	40
Figura 19 - Crescimento micelar (mm) de <i>B. cinerea</i> em contato com OE de <i>M. alternifolia</i> nas 2 $\mu$ L, 5 $\mu$ L, 10 $\mu$ L e 25 $\mu$ L ao longo do ensaio. ....	41
Figura 20 - Crescimento micelar (mm) de <i>B. cinerea</i> em contato com OE de <i>T. mastichina</i> nas quantidades 2 $\mu$ L, 5 $\mu$ L, 10 $\mu$ L e 25 $\mu$ L ao longo do ensaio. ....	41
Figura 21 - Crescimento micelar (mm) de <i>B. cinerea</i> em contato com OE de <i>P. ruderale</i> nas quantidades 2 $\mu$ L, 5 $\mu$ L, 10 $\mu$ L e 25 $\mu$ L ao longo do ensaio. ....	42
Figura 22 - Percentagem de inibição do crescimento de <i>B. cinerea</i> em contato com OE de <i>C. zeylanicum</i> , OE de <i>C. nardus</i> , OE de <i>M. alternifolia</i> , OE de <i>T. mastichina</i> e OE de <i>P. ruderale</i> em diferentes quantidades (2 $\mu$ L, 5 $\mu$ L, 10 $\mu$ L e 25 $\mu$ L) no 7 <sup>o</sup> dia do ensaio. ....	43
Figura 23 - Crescimento micelar (mm) de <i>P. chlamydospora</i> em contato com OE de <i>C. zeylanicum</i> nas quantidades 2 $\mu$ L, 5 $\mu$ L, 10 $\mu$ L e 25 $\mu$ L ao longo do ensaio. ....	46
Figura 24 - Crescimento micelar (mm) de <i>P. chlamydospora</i> em contato com OE de <i>C. nardus</i> nas quantidades 2 $\mu$ L, 5 $\mu$ L, 10 $\mu$ L e 25 $\mu$ L ao longo do ensaio. ....	46
Figura 25 - Crescimento micelar (mm) de <i>P. chlamydospora</i> em contato com OE de <i>M. alternifolia</i> nas quantidades 2 $\mu$ L, 5 $\mu$ L, 10 $\mu$ L e 25 $\mu$ L ao longo do ensaio. ....	47
Figura 26 - Crescimento micelar (mm) de <i>P. chlamydospora</i> em contato com OE de <i>T. mastichina</i> nas quantidades 2 $\mu$ L, 5 $\mu$ L, 10 $\mu$ L e 25 $\mu$ L ao longo do ensaio. ....	48

Figura 27 - Crescimento micelar (mm) de <i>P. chlamydospora</i> em contato com OE de <i>P. ruderale</i> nas quantidades 2 $\mu$ L, 5 $\mu$ L, 10 $\mu$ L e 25 $\mu$ L ao longo do ensaio.....	48
Figura 28 - Percentagem de inibição do crescimento de <i>P. chlamydospora</i> em contato com OE de <i>C. zeylanicum</i> , OE de <i>C. nardus</i> , OE de <i>M. alternifolia</i> , OE de <i>T. mastichina</i> e OE de <i>P. ruderale</i> em diferentes quantidades (2 $\mu$ L, 5 $\mu$ L, 10 $\mu$ L e 25 $\mu$ L) ao 4 <sup>o</sup> dia de ensaio. ....	49
Figura 29 - Crescimento micelar (mm) de <i>A. mellea</i> em contato com OE de Mekzol nas quantidades 2 $\mu$ L, 5 $\mu$ L, 10 $\mu$ L e 25 $\mu$ L ao longo do ensaio.....	51
Figura 30 - Crescimento micelar (mm) de <i>B. cinerea</i> em contato com OE de Mekzol nas quantidades 2 $\mu$ L, 5 $\mu$ L, 10 $\mu$ L e 25 $\mu$ L ao longo do ensaio.....	52
Figura 31 - Crescimento micelar (mm) de <i>P. chlamydospora</i> em contato com OE de Mekzol nas quantidades 2 $\mu$ L, 5 $\mu$ L, 10 $\mu$ L e 25 $\mu$ L ao longo do ensaio.....	52
Figura 32 - Percentagem de inibição do crescimento de <i>A. mellea</i> , <i>B. cinerea</i> e <i>P. chlamydospora</i> em contato com Mekzol em diferentes quantidades (2 $\mu$ L, 5 $\mu$ L, 10 $\mu$ L e 25 $\mu$ L). ....	53
Figura 33 - Percentagem de germinação de esporos de <i>B. cinerea</i> em contato com OE de <i>C. zeylanicum</i> nas quantidades 0,2 $\mu$ L, 0,5 $\mu$ L e 1 $\mu$ L ao longo do ensaio.....	54
Figura 34 - Percentagem de germinação de esporos de <i>B. cinerea</i> em contato com OE de <i>P. ruderale</i> nas quantidades 0,2 $\mu$ L, 0,5 $\mu$ L e 1 $\mu$ L ao longo do ensaio.....	54
Figura 35 - Percentagem de germinação de esporos de <i>B. cinerea</i> em contato com eugenol nas quantidades 0,2 $\mu$ L, 0,5 $\mu$ L e 1 $\mu$ L ao longo do ensaio. ....	55
Figura 36 - Percentagem de germinação de esporos de <i>B. cinerea</i> em contato com eugenol encapsulado nas quantidades 0,2 $\mu$ L, 0,5 $\mu$ L e 1 $\mu$ L ao longo do ensaio. ....	55
Figura 37 - Percentagem de inibição da germinação de esporos de <i>B. cinerea</i> em contato com OE de <i>C. zeylanicum</i> , OE de <i>P. ruderale</i> , eugenol e eugenol encapsulado em diferentes quantidades (0,2 $\mu$ L, 0,5 $\mu$ L e 1 $\mu$ L) ao fim de 24 h. ....	56
Figura 38 - Percentagem de germinação de esporos de <i>B. cinerea</i> em contato com 20 $\mu$ L “Zemea” ao longo do ensaio. ....	57

## Índice de tabelas

Tabela 1 - Sintomas de infecção por <i>Botrytis cinerea</i> associados aos estágios de desenvolvimento da planta [38]. .....	9
Tabela 2 - Sintomas da doença vascular provocada por <i>Phaeoconiella chlamydospora</i> [47]. .....	12
Tabela 3 – Componentes dos OEs de <i>C. zeylanicum</i> , <i>C.nardus</i> , <i>M. alternifolia</i> , <i>T. mastichina</i> e <i>P. ruderale</i> . .....	30
Tabela 4 - Comparação do efeito de cinco OE ( <i>C. zeylanicum</i> , <i>C. nardus</i> , <i>M. alternifolia</i> , <i>T. mastichina</i> , <i>P. ruderale</i> ) em diferentes quantidades (2 µL, 5 µL, 10 µL e 25 µL) no crescimento micelar em <i>Armillaria mellea</i> no final do ensaio.....	33
Tabela 5 - Comparação do efeito de cinco OE ( <i>C. zeylanicum</i> , <i>C. nardus</i> , <i>M. alternifolia</i> , <i>T. mastichina</i> , <i>P. ruderale</i> ) em diferentes quantidades (2 µL, 5 µL, 10 µL e 25 µL) no crescimento micelar em <i>Botrytis cinerea</i> no final do ensaio. ....	39
Tabela 6 - Comparação do efeito de cinco OE ( <i>C. zeylanicum</i> , <i>C. nardus</i> , <i>M. alternifolia</i> , <i>T. mastichina</i> , <i>P. ruderale</i> ) em diferentes quantidades (2 µL, 5 µL, 10 µL e 25 µL) no crescimento micelar em <i>Phaeoconiella chlamydospora</i> no final do ensaio .....	45
Tabela 7 - Comparação do efeito de Mezkol em diferentes quantidades (2 µL, 5 µL, 10 µL e 25 µL) no crescimento micelar em <i>A. mellea</i> , <i>B. cinerea</i> e <i>P. chlamydospora</i> no final do ensaio. ....	51

## **1. Introdução e Revisão bibliográfica**

---

### **1.1. Enquadramento histórico, cultural e económico da videira e do vinho**

O cultivo da vinha e a produção de vinho fazem parte da história da Europa e do resto do mundo, contribuindo para o seu desenvolvimento a nível cultural, social e económico [1]. Os primeiros relatos do cultivo da vinha remontam à Idade do Cobre e início da Idade do Bronze (3500-2300 A.C.) na zona do vale do rio Jordão [2].

No Sul da Europa e Mediterrâneo ocidental, a cultura da vinha e a produção de vinho foi introduzida pelos fenícios, gregos e romanos [3]. Atualmente, a Europa apresenta a maior área de vinha cultivada no mundo, aproximadamente 38 % [4]. O clima mediterrâneo apresenta as características ideais para o desenvolvimento da videira, com épocas de desenvolvimento do fruto longas e com temperaturas amenas a quentes e verões secos, perfeitos para o amadurecimento dos frutos [4].

No ano de 2014, segundo os dados recolhidos pelo Instituto Nacional de Estatística (INE) existia em Portugal uma área total de vinha cultivada de 178 986 ha, para produção de uva de mesa ou de vinho. Nesse mesmo ano foram produzidos cerca de  $6\,000 \times 10^3$  hl de vinho [5]. É uma indústria importante social e culturalmente com uma grande influência na estabilidade económica e no desenvolvimento do país, quer pelas exportações quer pelo turismo que atrai

Em Portugal há 13 regiões vinícolas (Figura 1) – Vinho verde (Minho), Trás-os-Montes, Porto e Douro, Bairrada, Dão, Beira interior, Lisboa, Tejo, Alentejo, Península de Setúbal, Algarve, Açores e Madeira [6] [7] [8].

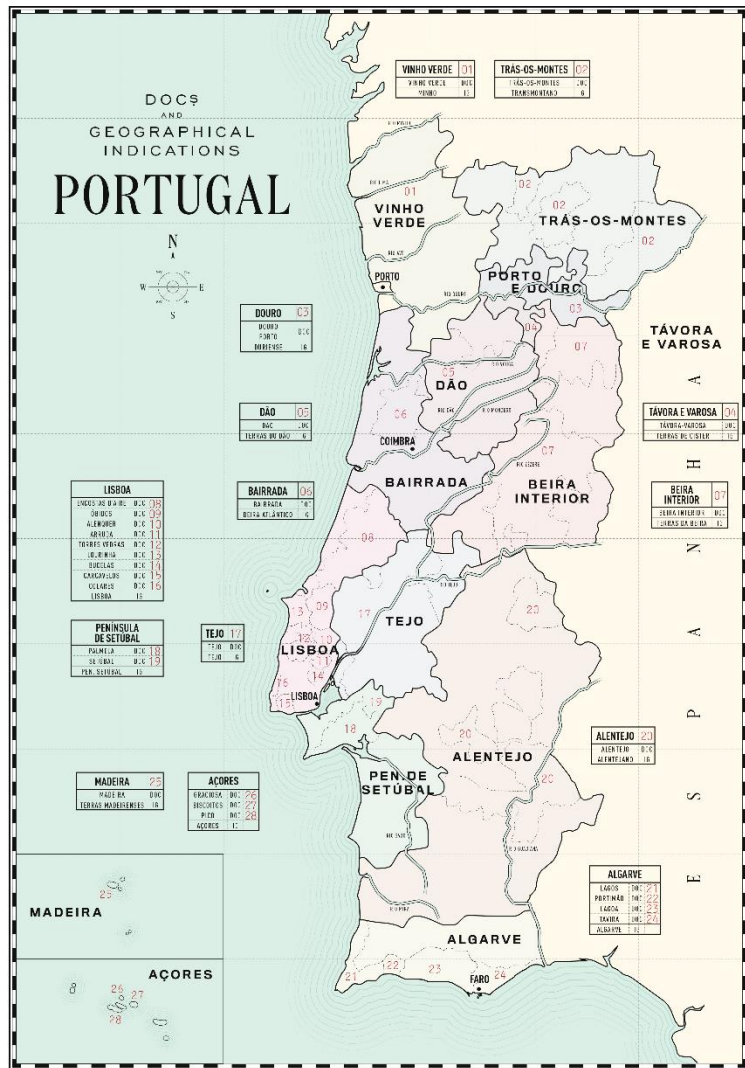


Figura 1 - As 13 regiões vinícolas portuguesas [8].

## 1.2. A videira (*Vitis vinifera* L.)

Pertencente à família Vitaceae (Reino: Plantae > Filo: Tracheophyta > Classe: Magnoliopsida > Ordem: Vitales > Família: Vitaceae > Género: *Vitis* > Espécie: *Vitis vinifera* [9]), o género *Vitis* compreende cerca de 60 espécies interférteis, sendo a *Vitis vinifera* uma das espécies vegetais mais importante do mundo [10].

A espécie *Vitis vinifera*, que se pensa ter sido domesticada na Arménia ou na Ásia [11], é hoje em dia cultivada um pouco por todo o mundo, existindo há cerca de 65 milhões de anos. Na Europa, Ásia e Norte de África existem duas subespécies *V. vinifera* subsp. *vinifera* (sativa) e *V. vinifera* subsp. *silvestris* (silvestre), não sendo esta última usada para fins comerciais podendo ter dado origem aos cultivares atuais por modificações genéticas [1].

Os frutos desta espécie, as uvas, são a matéria-prima utilizada para a produção de vinho. Parte das suas características organolépticas, como cor, aroma e sabor, devem-se à presença de compostos fenólicos – ácidos fenólicos, flavonoides, taninos, cumarinas, entre outros [11] [12].

### 1.3. Doenças na videira e os principais organismos responsáveis

A infecção de videiras por parte de fungos patogênicos representa um grave problema a nível global, já que são um obstáculo à quantidade e qualidade da produção de uvas e vinho [7]. Um grande número de diferentes doenças pode afetar a videira podendo ser provocadas por diferentes tipos de organismos, como fungos, bactérias, nemátodes ou vírus [13] (Figura 2).

Fungos	Bactérias	Nemátodes	Vírus
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Podridão radicular - <i>Armillaria mellea</i></li> <li>• Esca/Doença de Petri - <i>Phaeomoniella chlamydospora</i></li> <li>• Podridão cinzenta - <i>Botrytis cinerea</i></li> <li>• Míldio - <i>Plasmopara viticola</i></li> <li>• Oídio - <i>Uncinula necator</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• "Crown gall" - <i>Agrobacterium tumefaciens</i></li> <li>• Necrose bacteriana - <i>Xylophilus ampelinus</i>.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• "Root-knot" - <i>Meloidogyne</i> spp</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• "Grapevine leafroll disease" (GLRD) - <i>Ampelovirus</i>, <i>Closterovirus</i> e <i>Velarivirus</i></li> <li>• "Grapevine fanleaf degeneration disease" (GFDD) - <i>Nepovirus</i></li> </ul>

Figura 2 - Doenças da videira provocadas por diferentes organismos [11].

### 1.4. O reino Fungi

O reino Fungi compreende uma grande diversidade de organismos que interagem com plantas, animais e bactérias. Estima-se que existam 1,5 milhões de espécies fúngicas, estando



apenas descritas aproximadamente 100 000 espécies, contudo este número tem crescido 1.2 % a cada ano.

Está dividido em 5 filós [14]: chitriodiomicota, clastocladiomicota, glomeromicota, ascomicota e basidiomicota (Figura 3). Destes 5, os fungos patogénicos da videira pertencem aos últimos dois filós.

O filo ascomicota é o taxon maior, compreendendo aproximadamente 64 % das espécies do reino Fungi descritas. Contém três subfilós: Saccharomycotina, que inclui espécies utilizadas a nível industrial (ex. *Saccharomyces* spp) e parasitas; Pezizomycotina, cujas espécies têm a particularidade de proteger os asci (esporos) com estruturas multicelulares (ex. *Phaeoconiella chlamydospora*); e o mais divergente dos três Taphrinomycotina (ex. *Neolecta*). Podem viver como saprófitos, mutualistas ou parasitas, sendo os ascomicotas patogénicos uma grave ameaça na agricultura. São tipicamente haploides, e reproduzem-se assexuadamente por conídeos.

Já o filo basidiomicota: abrange 34 % do total das espécies de fungos. Com os subfilós Pucciniomycotyna, Ustilaginomycotina e o mais conhecido, Agaricomycotina, que inclui os fungos com corpos frutíferos, os cogumelos e algumas leveduras. Fazem também parte deste filo os fungos responsáveis pelas doenças do tronco. A reprodução acontece por fusão de hifas ou células (caso das leveduras). Os esporos produzidos, os basídios formam-se em talos que emergem do basidium.

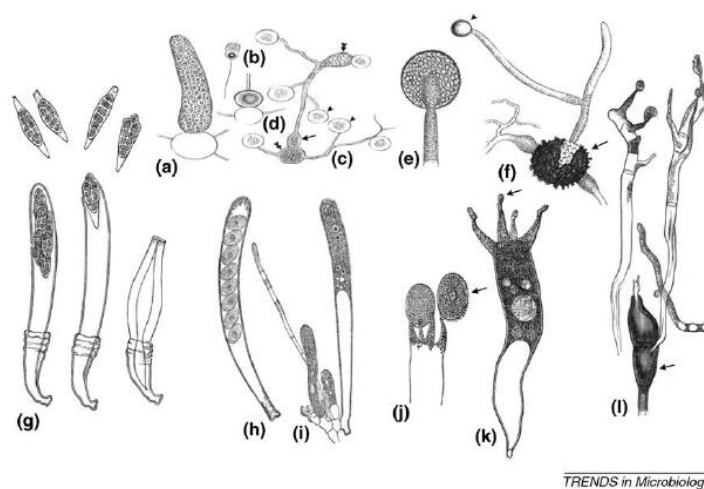


Figura 3 - Os filós do reino Fungi: (a-d) Chytridiomycota, (e,f) Zygomycete, (g-i) Ascomicota e (j-l) Basidiomycota [13].

#### 1.4.1. *Armillaria mellea* - Podridão radicular

A podridão radicular branca é considerada uma doença preocupante na medida que causa danos biológicos e económicos em diferentes culturas e que afeta especialmente climas temperados [16]. O agente que provoca a doença engloba espécies do género *Armillaria* (Reino: Fungi > Filo: Basidiomycota > Classe: Agaricomycetes > Ordem: Agaricales > Família: Physalacriaceae > Género: *Armillaria* > Espécie: *Armillaria mellea* [17]), basidiomicetes saprófitos já bastante estudados [16] [18].

Atualmente sabe-se que existem 36 espécies do género *Armillaria*, mas apenas algumas causam a doença que provoca o apodrecimento da raiz, e podem afetar qualquer espécie de árvores de floresta, arbustos, vinha e mesmo frutos. A espécie que causa distúrbios mais violentos e que se apresenta mais resistente a controlo químico é *Armillaria mellea* (Vahl ex Fr.) Kummer [19].

Este fungo consegue sobreviver no solo por longos períodos de tempo, mesmo na ausência de um hospedeiro vivo [20], o que é problemático no caso de culturas de vinhas, pois não existe praticamente nenhuma rotação de culturas e as plantas que eventualmente morrem são logo de seguida substituídas.

Em videiras, o reduzido vigor da planta e a má qualidade dos frutos são os sintomas principais da doença, sendo também possível detetar pelo aparecimento prematuro de folhas vermelhas ou amarelas no outono [20] bem como pelo menor número de folhas do que o normal [21], levando à morte da planta, que pode ocorrer só passado alguns anos após deterioramento das raízes.

As formas de tentativa de controlo do fungo, preferencialmente nos primeiros estágios, apresentam alguns desafios: conseguir penetrar até ao interior do tronco, onde este se está a desenvolver; contornar os mecanismos de defesa que o patogénico foi desenvolvendo; e ter uma boa capacidade de penetração no solo, já que o fungo pode estender-se até quase 3 metros de profundidade [22].

Encontram-se descritos três tipos de mecanismos de controlo: biológico, físico e químico.

Nos mecanismos de controlo biológico existem duas metodologias frequentemente adotadas: um armadilhas biológicas, como o morangueiro ou outra planta herbácea, que vai ser afetado antes da videira e dá a indicação de quais as zonas do solo que estarão contaminadas; e a inoculação de espécies antagonistas de outros fungos, que limitam a proliferação de *A. mellea* [22]. Ambas as soluções não são eficazes uma vez que o as armadilhas apenas sinalizam os locais já afetados pela doença e a inoculação de espécies antagonistas na maioria das vezes não resulta, isto porque *A. mellea* ocupa uma grande área do solo apenas tendo a capacidade de diminuir o nível de colonização do patogénico e limitar os recursos disponíveis [23].

Como mecanismo físico recorre-se ao escavamento do solo à volta da raiz da planta de forma a eliminar quaisquer rizomorfos/micélios que possam infetar a mesma. Este mecanismo para além de ter uma menor probabilidade de sucesso, também se apresenta demorado e dispendioso [22].

Já os mecanismos químicos, mais eficazes e por isso mais utilizados, incluem o uso de fumigação do solo [22]. Inicialmente recorria-se ao brometo de metilo, dissulfureto de carbono e o tetratiocarbonato de sódio [19], sem grande sucesso. Mais tarde descobriu-se a ação positiva de inibidores da biossíntese de esteróis (DMI), como o ciproconazol, o hexaconazol, o propiconazol e o tetraconazol [21], como eficientes no controlo de *A. mellea*. A fumigação com estes compostos tem a desvantagem de não eliminar na totalidade a doença, podendo ser dispendioso e causar danos nas plantas envolventes [22].

Face à ineficácia dos métodos tradicionais e às recorrentes tentativas de implementação de métodos de controlo que não impliquem o uso de produtos químicos nocivos para o solo, a planta e a saúde pública, novos fungicidas têm sido explorados.

#### 1.4.2. *Botrytis cinerea*– Podridão cinzenta (“bunch rot”)

A podridão cinzenta é uma das mais importantes doenças da videira e da uva [24] e causa enormes prejuízos à indústria vitivinícola [25]. Esta doença reduz o rendimento da cultura e altera as características organolépticas do vinho: odor, sabor e claridade. A qualidade

do vinho é afetada pela redução de monossacarídeos (glucose e frutose), pela acumulação de metabolitos (glicerol e ácido glucónico) e de lacases (fenol oxidases) [26].

A espécie responsável por esta doença, *Botrytis cinerea* Pers. [*Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetz.] (Reino: Fungi > Filo: Ascomycota > Classe: Leotiomycetes > Orde: Helotiales > Família: Sclerotiniaceae > Género: *Botrytis* > Espécie: *Botrytis cinerea* [27]), é um agente patogénico saprófito e necrotrófico. Este pode afetar cerca de 235 espécies vegetais diferentes, como as culturas de morango, batata, cebola, kiwi, tomate, framboesa e videira [28] [29] [30], podendo causar perdas de produtividade [31].

Na natureza, *B. cinerea* reproduz-se essencialmente de forma assexuada, na primavera e no verão, sendo dispersado principalmente pelo vento ou por atividades do homem [32]. Na videira, o fungo ataca todas as partes aéreas da planta [33], infetando principalmente as zonas debilitadas da planta. As plantas ficam ainda mais suscetíveis à infeção após a chuva, vento forte, gelo e intervenções por aves, insetos ou caracóis, provocando danos nos bagos [26] [34].

A infeção depende do estágio de desenvolvimento do ciclo de crescimento da planta, uma vez que normalmente ocorre durante a floração e é seguida por um período de latência, podendo só demonstrar sintomas quando os frutos começam a amadurecer [35]. A contaminação por conídeos, aquando do amadurecimento dos bagos, é considerada tão invasiva como as infeções latentes no caule ou folhas da planta [36]. Pode ocorrer por dois órgãos distintos: pelas flores, através das pétalas, estigma, estiletos ou estames; ou pelas uvas, através do pedicelo, feridas ou penetração direta na cutícula. Depois de entrar na planta, o agente patogénico pode ficar em estado latente por um longo período de tempo, sendo reativado em casos de amadurecimento da uva ou de ambiente favorável - de 15 a 20 °C e com 95 % de humidade relativa [34]. Tal dificulta a certeza da qualidade dos frutos, podendo causar grandes danos a nível económico [37]. Um pequeno resumo dos sintomas está apresentado na Tabela 1.

O desenvolvimento da doença pode variar consoante a suscetibilidade do fruto. Considera-se que o fruto é mais suscetível à doença quando o cacho é mais fechado. Há uma alteração do microclima, da espessura e do conteúdo em cera da cutícula do bago [36].

Tabela 1 - Sintomas de infecção por *Botrytis cinerea* associados aos estágios de desenvolvimento da planta [38].

Estágio de desenvolvimento da planta	Sintomas
<b>Antes da floração</b>	Invasão de inflorescências em desenvolvimento e infecções graves causam secura e queda das mesmas
<b>Durante a floração</b>	Manchas necróticas castanhas nas folhas e inflorescências; Infecção de estigmas, estiletos e estames (crescendo em direção ao recetáculo e tecido vascular)
<b>No final ou após floração</b>	Desenvolvimento do fungo nos florescimentos, estames e bagos abortadas ainda no cacho; posterior ataque do pedicelo, formando lesões de podridão escuras
<b>Durante o amadurecimento do fruto</b>	Podridão nos cachos

É fundamental aplicar diferentes estratégias para o combate da doença, devido à elevada epidemiologia de *B. cinerea*, combinando o tratamento com pesticidas e práticas agrícolas [39]. A aplicação de fungicidas (sistêmicos ou de contacto), embora nunca deva ser em demasia, deve acontecer antes e depois da colheita das uvas, pois os bagos são muito suscetíveis a infecção mesmo a baixas temperaturas, o que encurta a duração de armazenamento e presença no mercado [34] [40].

Como métodos agrícolas, faz-se a gestão da copa: quer pela remoção das folhas à volta dos cachos, o que promove a sua exposição ao sol, aumenta a produção de cera epicuticular e forma uma cutícula mais resistente; quer pela diminuição do número de bagos por cacho ou mesmo optando por híbridos mais resistentes à doença [33] [37] [39] [41].

Antes da colheita, a aplicação de fungicidas acontece, normalmente, nos seguintes estágios de crescimento:

a) durante a floração até à criação do fruto – para prevenir estabelecimento de infecções latentes e para limitar a colonização dos restos florais;

b) antes de os bagos se tocarem entre eles – última oportunidade para cobrir a totalmente a superfície dos bagos e dos raquis;

c) início do “veraison” – nesta fase em que as uvas começam a amadurecer e há presença de uma elevada concentração de açúcar disponível para a proliferação do fungo,

aplica-se o fungicida para proteger bagos saudáveis suscetíveis a novas infecções e para suprimir a reativação de infecções latentes;

d) 2 a 4 semanas depois do “veraison” (antes da colheita) – para combater propagação secundária [39] [42].

Em culturas orgânicas são comumente usados produtos à base de cobre (mistura de “Bordeux” ou calda bordalesa e sulfato de cobre) o que, pode alterar a qualidade do vinho, modificando os compostos aromáticos e acumulando sulfureto de hidrogênio, que confere um cheiro característico, podendo este ainda ser fitotóxico e acumular-se nos solos, causando clorose nas folhas e baixando a atividade biológica dos solos [34].

A prevenção da podridão cinzenta, tal como de outras doenças, é normalmente realizada com fungicidas sintéticos. Contudo, estes têm vindo a ser menos aceites na indústria quer pelos impactos negativos que apresentam no ambiente e na saúde humana quer pelo desenvolvimento de estirpes resistentes [25]. Adicionalmente, o uso destes fungicidas, como o dióxido de enxofre, afetam a qualidade da uva provocando branqueamento dos bagos e escurecimento do raquis [41]. Desta forma, várias alternativas aos fungicidas sintéticos têm sido estudadas para o controlo de *B. cinerea*:

- Controlo biológico por ação de bactérias, fungos filamentosos ou leveduras [29] [34] [39];
- Bioestimulantes de defesa da planta, como hormonas vegetais, extratos de plantas, estimulantes abióticos ou por micróbios [34];
- Modificação do habitat, englobando medidas de gestão de habitat [44];
- Aplicação de óleos essenciais ou minerais [34] [54].

#### 1.4.3. *Phaeomoniella chlamydospora* – Complexo da doença de Petri

Esta doença é conhecida e estudada há mais de 100 anos, na zona do Mediterrâneo e na Califórnia [43]. Atualmente é considerada como um conjunto de doenças, denominando-se complexo da doença da esca, dividindo-se em duas: esca (“white wood rot”) e a doença vascular. A doença vascular pode-se manifestar de três formas: “brown wood streaking”, doença de Petri e doença das folhas-riscadas da vinha (“grapevine leaf-stripe disease” - GLSD) [44].

Os principais fungos responsáveis pelo complexo de doença da Esca são *Phaeomoniella chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum* e *Fomitiporia mediterranea*.

O ascomicota *Phaeomoniella chlamydospora* (W.Gams, Crous, M.J. Wingf. & L. Mugnai) (Reino: Fungi > Filo Ascomycota > Classe: Eurotiomycetes > Ordem: Phaeomoniellales > Família: Phaeomoniellaceae > Género: *Phaeomoniella* > Espécie: *Phaeomoniella chlamydospora* [45]) de entre os três mencionados é dos mais agressivos e o mais encontrado em qualquer zona do globo [46]. Este é capaz de causar Esca em videiras maduras (> 7 anos), doença de Petri em videiras jovens (< 7 anos) [10] e ainda “brown wood streaking” [47].

A sua reprodução será apenas clonal (assexuada), já que ainda não foi descrito um teleomorfo, evidenciado pela homogeneidade das populações estudadas em países como Itália, Espanha e mesmo Nova Zelândia [46].

Como acontece em qualquer doença do tronco, o fungo cresce lenta e silenciosamente e só apresenta sintomas ao nível das folhas (sintomas visíveis) quando já é tarde demais para evitar a perda da planta na sua totalidade [44]. Há inclusive estudos que apontam para a presença de inóculos aéreos (esporos) que são libertados durante a queda de chuva [48] e nas condições climáticas podem infetar a planta através de feridas suscetíveis [49]. Alguns dos principais sintomas do complexo da doença da esca estão apresentados na Tabela 2.

Caso uma planta se encontre afetada pelas duas doenças do complexo da doença da esca em simultâneo passa-se a designar “esca proper” [44].

Em casos mais avançados de infeção pode evoluir para apoplexia, sendo a forma aguda da GLSD e/ou da “esca proper” [50]. A apoplexia acontece muito rapidamente (em apenas poucos dias) e é favorecida em estações do ano mais quentes, principalmente se a época de chuva for seguida de um clima seco e quente. Os principais sintomas são a completa secura de toda a vinha, mesmo dos frutos; as folhas verdes primeiro tornam-se pálidas (clorose) e de seguida verde-acinzentadas [51]. Pensa-se que os sintomas foliares da esca se originam no transporte de toxinas do caule para as folhas e/ou da interrupção do fluxo de seiva nos vasos condutores [52].

Tabela 2 - Sintomas da doença vascular provocada por *Phaeoconiella chlamydospora* [47].

Estado da doença	Sintomas	
<b>BWS - Brown wood streaking</b>  (planta ainda sem folhas)	Sinais externos	Não existentes
		Sinais internos
	Marcas escuras que se concentram mais no centro, formando um anel (corte transversal)	
	Libertado um exsudado preto pegajoso pelos vasos, quando cortados	
<b>Doença de Petri</b>  (plantas jovens)	Sinais externos	Atrofia de toda ou de parte da vinha
		Paragem do crescimento
		Clorose moderada das folhas
		Perda de produção/rendimento
		Declínio gradual do vigor da planta
		Pode acabar em morte total da planta ou progredir para Esca
	Sinais internos	Libertação de substância escura e gomosa pelos vasos, quando cortados, que seca
		Medula escurecida ou anel negro à volta desta
<b>Leaf-strike disease</b>	Sinais externos	Manchas arredondadas de descoloração nas folhas, entre as veias ou nas bordas, que acabam por ficar necróticas
		Em casos avançados, as folhas apresentam um aspeto “riscado”, com largas manchas de clorose e necrose
		Nos frutos, pequenas manchas, de cor castanho-escura ou roxa
	Sinais internos	Manchas negras (semelhante a BWS e Doença de Petri)
		Áreas com necrose



Numa doença caracterizada pela sua agressividade e facilidade de infeção, (ex. eutipiose, “black dead arm”, “black-foot disease”) é imprescindível por em prática um conjunto de medidas, que passam pelos métodos agrícolas, higienização, controlo biológico e tratamento químico [53]. Uma vez que ainda não existem formas de erradicar a doença, o controlo em videiras já afetadas passa pela remoção das partes mortas da vinha e realização de novo enxerto das vinhas afetadas, aplicação de protetores químicos (ex. metil tiofanato -  $C_{12}H_{14}N_4O_4S_2$ ) ou biológicos nos pontos/feridas de poda para reduzir a proliferação da doença e biocontrolo. Também é importante a desinfecção do material usado na poda, sendo o mais usual o tratamento com água quente [44], uma vez que as feridas causadas pela poda são o local mais suscetível à entrada dos fungos patogénicos das doenças do lenho [52]. Os fungicidas usualmente aplicados e que apresentam melhores resultados são o benomil ( $C_{14}H_{18}N_4O_3$ ), fenhexamida ( $C_{14}H_{17}Cl_2NO_2$ ), fosetil-alumínio ( $C_6H_{15}AlO_9P_3$ ), piraclostrobina ( $C_{19}H_{18}ClN_3O_4$ ), pirimetanil ( $C_{12}H_{13}N_3$ ), tebuconazol ( $C_{16}H_{22}ClN_3O$ ) e metil tiofanato ( $C_{12}H_{14}N_4O_4S_2$ ) [48].

O arsenito de sódio é o único pesticida que apresenta um controlo eficaz no tratamento da doença. Contudo, em 2001 este começou a ser banido em alguns países, incluindo Portugal, uma vez que apresenta uma elevada toxicidade, é carcinogénico, provoca danos citogénicos e irritações cutâneas, oftalmológicas e respiratórias [54]. Nos últimos anos têm sido procurados e estudados novos métodos para o tratamento da doença face à ausência de estratégias de controlo. Alguns estudos focam-se no uso de microrganismos para controlar os fungos patogénicos associados à esca [55].

### **1.5. O uso de fungicidas**

Em França, um dos países com a maior produção de vinho do mundo, de todos os tipos de pesticidas aplicados, cerca de 80% são fungicidas [56]. O mais usado é a mistura de Bordeaux, à base de cobre (Cu), que tem efeitos tóxicos em tecidos jovens e é corrosivo. Outros fungicidas químicos incluem: metalaxil, tiofanato-metilo e cimoxanil [57].

A vinha está dependente deste tipo de controlo, uma vez que tem um papel fulcral na prevenção do aparecimento de pestes e doenças, controla as ervas envolventes, aumenta os

níveis de rendimento dos frutos e assegura uma boa qualidade do vinho [53]. Mas, tudo isto à custa de contaminar o ambiente, causar fitotoxicidade, poder destruir outras espécies envolta e que por vezes são benéficas ao controle de pragas e promover o aparecimento de resistências [58].

Um problema importante prende-se na deposição destes compostos na água e no vinho, que serão para consumo humano [59]. Um estudo recente feito em Portugal mostra como alguns destes compostos persistem nos solos, mesmo passados anos da sua aplicação, tornando o solo ácido e pobre em macronutrientes. O seu arrastamento para cursos de água é facilitado em vinhas plantadas em socalcos, como acontece no Douro [60].

Mais do que nunca, há a necessidade de encontrar alternativas viáveis quer a nível ambiental ou social. Como é o caso dos óleos essenciais.

## **1.6. Óleos essenciais (OE)**

Os óleos essenciais (OE) podem ser obtidos através das flores, raízes, tronco, folhas, frutos, sementes ou outras partes de uma planta, e têm o mesmo nome que a planta de onde é obtido. Foram explorados pela maioria das civilizações da História, com aplicações que vão desde a culinária à medicina, passando pela cosmética e perfumes. São misturas complexas, normalmente líquidas à temperatura ambiente, formadas no citoplasma das células, mas normalmente acumuladas em tecidos e estruturas específicas (como os tricomas e canais secretores), voláteis e aromáticas. A constituição do OE varia muito dentro da mesma espécie, dependendo da zona da planta de onde é retirado, do método de extração, das características genéticas da planta, do local de cultivo, da altura de colheita e do estado de desenvolvimento e da idade da planta [61] [62]. Na planta, têm como função a atrair agentes polinizadores, usados como mecanismo de defesa, repelente, irritante, e conferem à planta proteção antifúngica e antibacteriana [61].

Os métodos de extração mais usados englobam a destilação (hidrodestilação, destilação por vapor ou uma junção de ambas), extração a frio, por solvente, *enfleurage*, e outros métodos recentemente desenvolvidos como a extração com fluídos supercríticos e extração assistida por micro-ondas ou ultrassons. A forma como são extraídos influencia

muito a composição química, provocando diferenças na quantidade dos compostos presentes, mas são maioritariamente constituídos por metabolitos secundários lipofílicos e altamente voláteis - terpenos (ex. mono e sesquiterpenos) e fenóis alílicos e isoalílicos [61] [63].

Os OE têm vindo a ser considerados como uma boa hipótese alternativa aos fungicidas químicos. As suas características antifúngicas já são estudadas e conhecidas há muitos anos, sendo que alguns já são aplicados na medicina, e agora começa-se a verificar que são boas opções no combate a patógenos de plantas e frutas, pois às suas propriedades fungitóxicas (ação antimicrobiana) acumulam a capacidade de eliciar respostas de defesa no hospedeiro (ação antimicrobiana indireta) [57] [64] [65]. Adicionalmente, não apresentam sinais de desenvolvimento de resistência por partes de microrganismos patogénicos [66].

As formas de utilização de OE como fungicidas podem tomar várias formas, podendo ser aplicados por [67]:

- Imersão – Método prático de higienização;
- Vaporização – Como “atmosfera protetora” de embalagens (embalagens ativas) [68] ou aplicado em câmaras de armazenamento;
- Revestimentos (*coatings*) – Mais trabalhoso, requer o revestimento de cada fruto (bago);
- Revestidos por nanopartículas, para aplicações na preservação de alimentos.

Como desvantagem, há o problema de serem extremamente voláteis e bioativos, sendo que os aromas libertados pelo óleo podem alterar as características organolépticas das uvas e conseqüentemente do vinho [64] [67]. Este aspeto pode ser revertido pela junção de vários OE numa mistura, e num estudo recente demonstrou-se que também têm a capacidade de serem mais eficazes na limitação do crescimento e prolongamento da fase de latência de fungos [69].

Uma vez provada a eficaz atividade antifúngica dos OEs aplicados, um dos objetivos traçados por investigadores para o futuro, passa por desenvolver um método mais completo, que combine a concentração de OE, duração do tratamento, tempo de aplicação e tipo de OE [64].

### 1.6.1. Óleo Essencial de *Cinnamomum zeylanicum* Blume

*Cinnamomum zeylanicum*, da família Laureaceae, uma planta tropical perene, nativa do Sri Lanka, e que cresce em Madagáscar, Índia e Indochina [70], é a planta de onde se extrai a canela e o óleo essencial com o mesmo nome. Apresenta um aroma bastante forte e característico e tem vindo a ser estudado pelas suas propriedades antimicrobianas, inseticidas, antioxidantes, anti mutagénicas, tendo um grande papel na redução da incidência de doenças cardiovasculares, ajuda nas funções cognitivas e reduz o risco de cancro do colon [71]. Foi classificado como seguro (GRAS – Generally recognized as safe) pela USFDA (United States Food and Drug Administration) [67], pelo que pode ser usado como constituinte em

drogas ou alimentos. É usado na medicina tradicional para ajudar na cura de doenças do trato respiratório, digestivo e ginecológico [71]. O OE é

geralmente obtido das folhas, tronco e das raízes por destilação por arraste a vapor [72]. Os principais constituintes –

hidrocarbonetos monoterpénicos, monoterpénicos oxigenados, hidrocarbonetos sesquiterpénicos, hidrocarbonetos oxigenados, hidrocarbonetos diterpénicos e diterpénicos oxigenados (Figura 4)

[72] - variam bastante na sua composição de óleos provenientes de diferentes partes da planta: eugenol nas folhas, cinamaldeído no tronco e cânfora nas raízes [71].

Compostos fenólicos, como o eugenol e o cinamaldeído, têm a

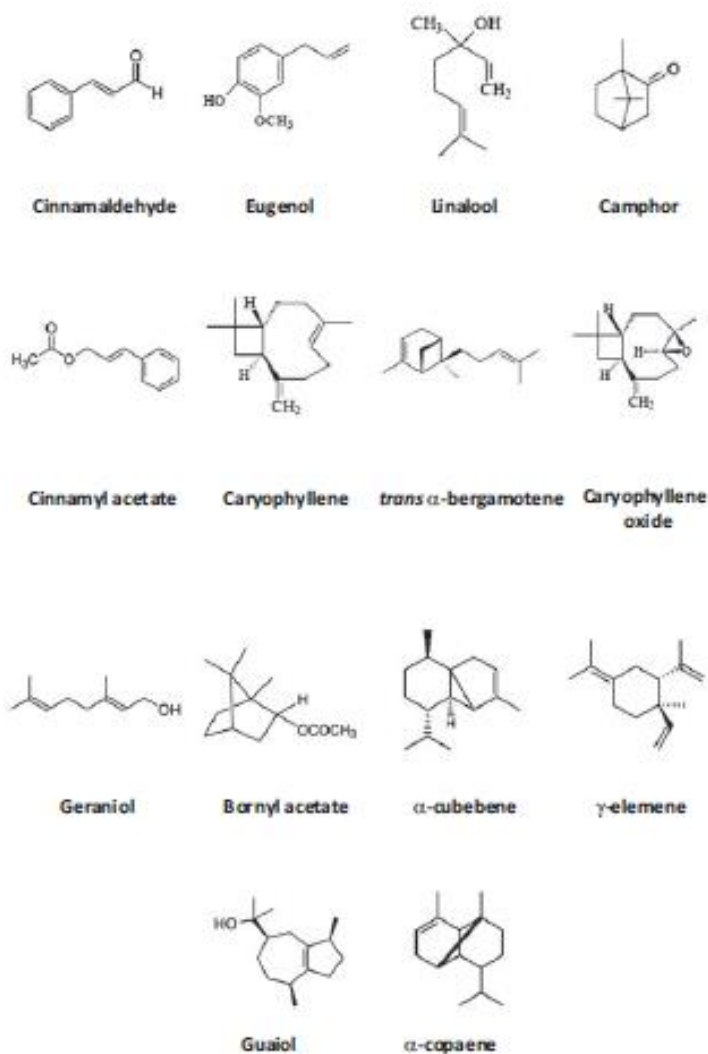


Figura 4 - Estrutura química dos componentes maioritários em *Cinnamomum zeylanicum* [50].

capacidade de danificar as células dos fungos, dificultando o seu desenvolvimento, e conseguem neutralizar radicais livres, que são produzidos pela planta em resposta à infecção [67].

O eugenol (4-alil-2-metoxifenol) é um composto aromático presente nas folhas de *C. zeylanicum* em cerca de 70 a 75 %. Tem um papel importante na composição do OE de canela, com propriedades antioxidantes, nematodocidas, inseticidas, bactericidas, anti-inflamatório, anestésico e fungicida [73]. É usado em perfumes, como aromatizante ou mesmo como antisséptico local contra bactérias em alimentos [74].

### 1.6.2. Óleo Essencial de *Cymbopogon nardus* L.

*Cymbopogon nardus*, de seu nome comum citronela, é uma planta indígena do Sri Lanka e é também cultivada no Mianmar, Malásia, Indonésia, Ilhas Fiji, Índia [75], Tailândia, América central e do sul e África, da família Poaceae (Gramineae). Não produz flores, pelo que se propaga por sementes ou por divisões da raiz. É usado na indústria alimentar como conservante de características organolépticas e neutralizante de patogénicos. É também considerado GRAS pela USFDA [76]. Tem como principal aplicação o uso em fórmulas repelentes de mosquitos [77]. É também desde há muito usado na cozinha *Thai*, vietnamita e sul asiática pelo seu sabor cítrico, assim como em bebidas. Na medicina Ayurveda é aplicado no tratamento de doenças infecciosas e febre [76]. Já na indústria cosmética, é um dos constituintes de sabões ou perfumes, por exemplo [78].

O OE é extraído das partes aéreas da planta e é principalmente constituído por citral, citronelal, citronelol, neral e geraniol (Figura 5), ingredientes ativos que

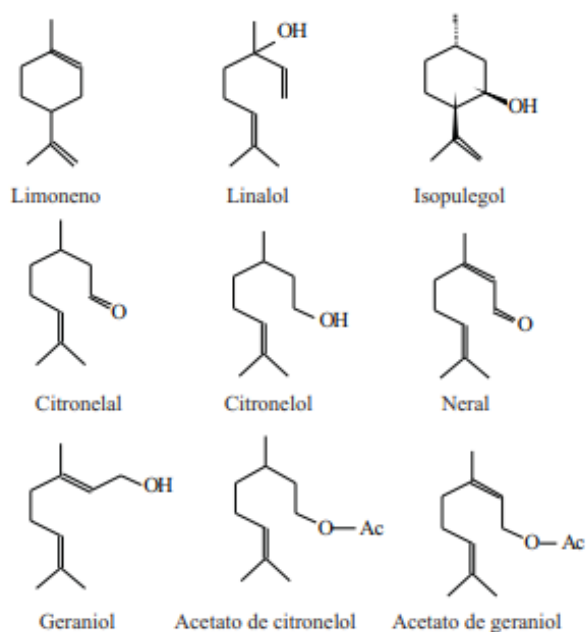


Figura 5 - Estrutura química dos constituintes de *Cymbopogon nardus* [109].

têm um papel na inativação de fungos patogênicos [76] [79]. Possui capacidades antimicrobianas, antifúngicas, antioxidantes, analgésicas, anti nociceptivas, neuro comportamentais e inseticidas [80].

Pode ser extraído por destilação por arrasto de vapor ou extração com fluido supercrítico [76].

Estudos já demonstraram o seu efeito contra alguns fungos patogênicos, incluindo *Botrytis cinerea*, podendo ser um bom aliado à conservação de alimentos após colheita.

### 1.6.3. Óleo Essencial de *Melaleuca alternifolia* L.

Esta planta indígena da Austrália, Nova Zelândia, Papua Nova Guiné, Ilhas Salomão, Indonésia, Malásia, Mianmar, Camboja, Tailândia e Vietname é a espécie mais importante do gênero *Melaleuca* [81], sendo conhecida como árvore do chá. É um arbusto/pequena árvore da família Myrtaceae que se consegue adaptar a uma grande variedade de habitats, mas desenvolve-se melhor em ambientes quentes e húmidos [81] [82].

É tradicionalmente utilizada para tratamento de feridas, picadas de insetos e infeções cutâneas, tendo sido bastante usada na II Guerra Mundial pelos soldados Australianos como repelente de insetos e agente antimicrobiano [81].

Atualmente é usada também na indústria cosmética, pelos seus efeitos antimicrobianos, em especial para o tratamento da acne, em cremes, champôs ou protetores solares [81].

Já se provou ter propriedades antibacterianas, antivirais e antifúngicas [82]. De entre os mais de 100 componentes na sua constituição química, o ativo responsável pelas propriedades antimicrobianas é um monoterpeneo – terpineno-4-ol (Figura 6), representando pelo menos 30%, sendo que pode variar bastante dependendo da estirpe, clima, idade das folhas, tipo de maceração e duração do processo de hidrodestilação [81] [82].

Embora o referido monoterpeneo seja o principal agente antibacteriano, estudos mostraram que o efeito é maior quando aplicado o OE e não apenas terpineno-4-ol. Nas células do agente patogênico, os terpenos interagem com a membrana celular alterando a sua permeabilidade [82].

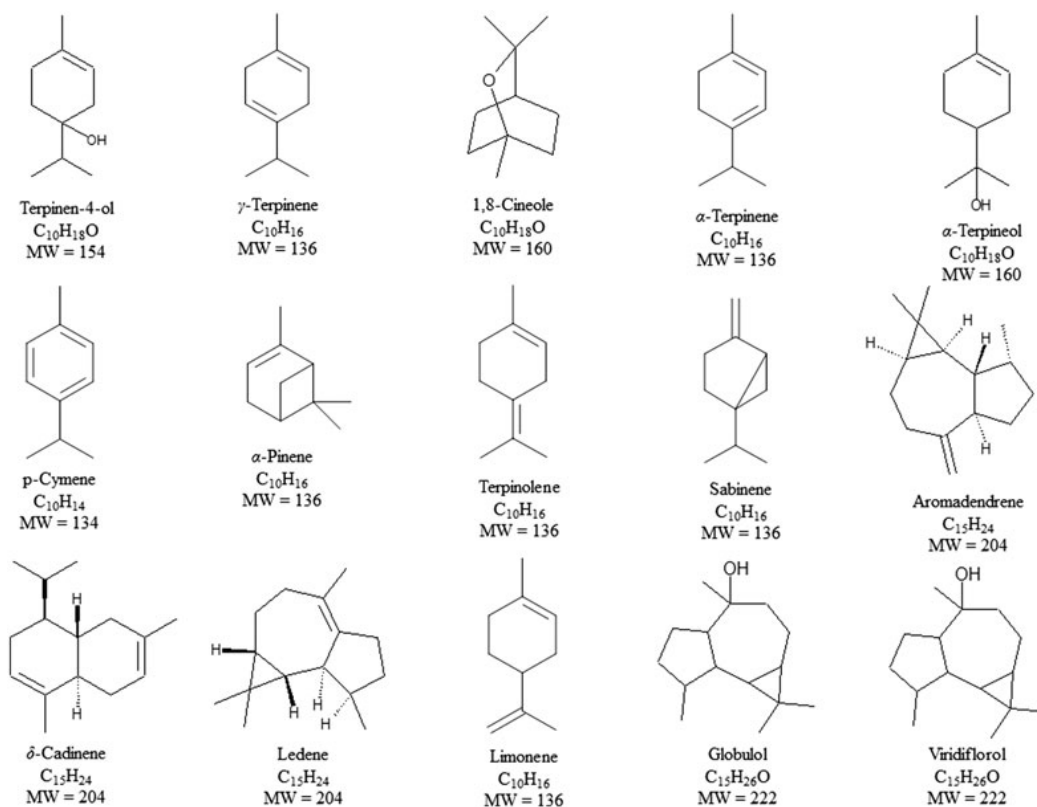


Figura 6 - Estrutura química dos constituintes de *Melaleuca alternifolia* [78].

#### 1.6.4. Óleo Essencial de *Thymus mastichina* L.

Esta espécie da família das Lamiaceae, conhecida por tomilho bela-luz, sal-puro, amáraco ou tomilho-alvadio-do-algarve, é uma erva perene endémica que cresce um pouco por todo o território Português, sendo observada com maior incidência na zona de Trás-os-Montes, Beira Interior e Algarve. Cresce preferencialmente em margens e declives de estrada, campos de cultivo abandonados, rochas, florestas de pinheiros e em substrato de pedra calcária [83].

O género *Thymus* é normalmente associado a propriedades antifúngicas (82), e esta espécie endémica Portuguesa em particular é considerada uma planta medicinal, com propriedades antissépticas, antiespasmódicas, expetorante e ação redutora de flatulência, e também bastante usada na cozinha tradicional Portuguesa em temperos de carne ou como aromatizante [84].

Estudos já comprovaram o seu efeito contra patógenos como *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori* e *Candida albicans* [84].

O OE é geralmente extraído pelo método de hidrodestilação, e os compostos principais são o 1,8- cineole, linalool e borneol (Figura 7) [84]. A composição do OE pode variar dependendo da espécie, características ambientais e ecológicas do local em que a planta cresceu, condições agronómicas, tipo de extração e altura da colheita [85].

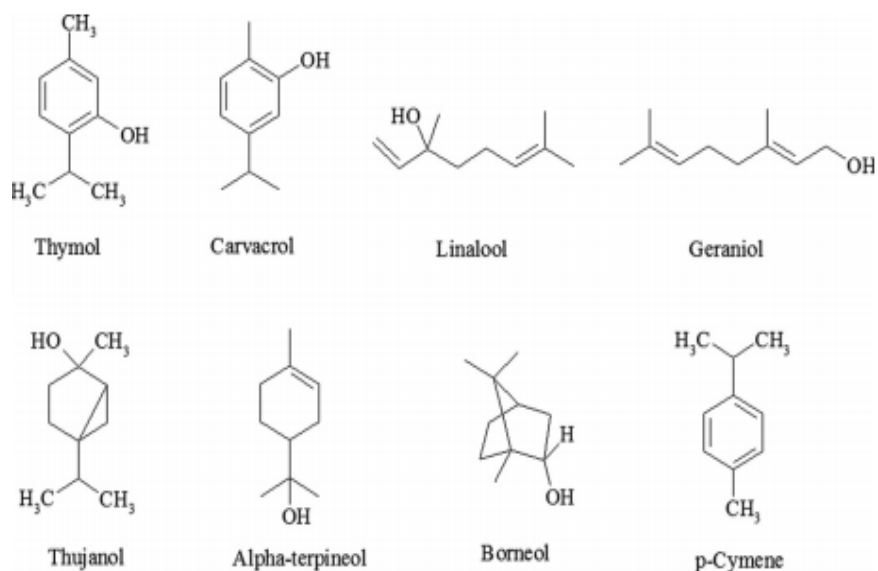


Figura 7 - Estrutura química dos constituintes de *Thymus mastichina* [110].

#### 1.6.5. Óleo Essencial de *Porophyllum ruderale* Jacq.

Amplamente distribuída desde o sudoeste dos EUA à América do Sul, esta erva aromática da família Asteraceae [86], adota os nomes comuns: couve cravinho, couvinha e cravo urubu [87]. Para além da espécie referida, o género *Porophyllum* contempla mais de 28 espécies, mas esta em particular é destacada por ter nas folhas, longitudinalmente à margem e até ao interior e dispersas por toda a lâmina, glândulas secretoras translúcidas, que na planta agem como defesa contra insetos ou microrganismos [88].

O OE é extraído por hidrodestilação, destilação das raízes secas [88] e das folhas [87]. É usado na medicina tradicional como cicatrizante, tratamento de dores em geral, com ação anti-inflamatória, antibacteriana e antifúngica. Deve a ação cicatrizante à presença de compostos fenólicos na sua composição [89].



Os componentes do OE mais encontrados são monoterpenos como o limoneno, sabineno e mirceno nas folhas (Figura 8), o que confirma que a ação antimicrobiana está relacionada com este óleo produzido em glândulas secretoras [88].

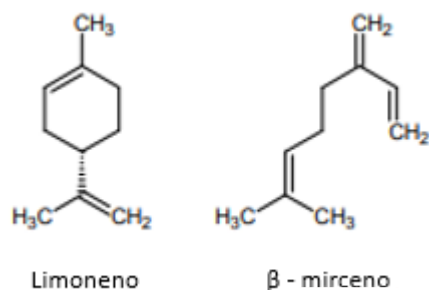


Figura 8 - Composição química de *Porophyllum ruderale* [111].

## Objetivos

O principal objetivo deste trabalho de investigação centra-se na procura de uma alternativa mais ecológica e socialmente aceite à utilização de fungicidas químicos, que representam uma grande parte do controlo antifúngico aplicado atualmente, indo de encontro às novas necessidades de mercado e mudança de mentalidades.

Neste trabalho, testando cinco OEs diferentes (*Cinnamomum zeylanicum*, *Cymbopogon nardus*, *Melaleuca alternifolia*, *Thymus mastichina* e *Porophyllum ruderale*) em contacto com três espécies de fungos patogénicos da videira (*Armillaria mellea*, *Botrytis cinerea* e *Phaeomonia chlamydospora*), pretende-se:

- Avaliar a capacidade de inibição do crescimento micelar e da germinação de esporos em contato com o OE;
- Estudar o efeito de um composto ativo maioritário de um OE (eugenol) na germinação de esporos de *B. cinerea*;
- Aplicação do referido composto maioritário encapsulado em micropartículas para avaliação da inibição da germinação de esporos;
- Testar um produto químico, já comercializado, na inibição do crescimento do micélio das três espécies testadas.

## **2. Materiais e Métodos**

---

## 2.1. Material biológico

Duas das três culturas utilizadas nos ensaios realizados foram obtidas através da propagação de culturas da Coleção de Recursos Biológicos do Departamento de Biologia da Escola de Ciências da Universidade do Minho, preservadas em glicerol e mantidas a -80 °C: *Armillaria mellea* (E2), *Phaeoconiella chlamydospora* (P50). A espécie *Botrytis cinerea* foi propagada a partir de uma estirpe do aluno de Doutoramento da Universidade do Minho, Richard Gonçalves, orientado pelo Professor Hernâni Gerós. Todas as culturas foram mantidas a 4 °C em câmara frigorífica e repicadas pelo menos uma vez por mês, para manter as culturas jovens e com condições favoráveis de crescimento.

*A. mellea* e *P. chlamydospora* desenvolveram-se em meio com *malt extract agar* (MEA) – bacto malt agar (Difco) a 4,5 %, glicose (2 %) e peptona (0.6 %), a temperatura média de 30 °C, durante aproximadamente 15 dias. Já *B. cinerea*, foi propagada em meio *potato dextrose agar* (PDA) - preparado com caldo de batata (20 %), glicose (2 %) e agar (2 %), à temperatura média de 25 °C, durante aproximadamente 15 dias.

## 2.2. Avaliação da atividade antifúngica

### 2.2.1. Testes da inibição do crescimento micelar com óleos essenciais

Em condições *in vitro*, culturas de *A. mellea*, *B. cinerea* e *P. chlamydospora* com cerca de 15 dias de crescimento foram inoculadas em contacto com os OE segundo o método usado por Guynot et al. [92]. Utilizou-se o mesmo método de avaliação para todos os fungos.

Um inóculo com cerca de 6mm de diâmetro, retirado da zona mais distante ao centro da cultura, foi colocada no centro de uma placa de *petri* (55 mm) em meio de cultura [93]. No centro da tampa da placa, exatamente por cima do inóculo, posicionou-se um quadrado de papel de filtro (1 cm<sup>2</sup>) que foi depois impregnado com quatro quantidades diferentes de OE (2 µL, 5 µL, 10 µL e 25 µL) (Figura 9). As placas foram depois seladas com parafilme e colocadas em sacos fechados (um para cada OE), para evitar a

perda de OE por evaporação [94] . Para cada concentração de OE fizeram-se triplicados. Paralelamente, fizeram-se controlos. Estes não continham papel de filtro nem qualquer OE, apenas o inóculo, para se avaliar as diferenças no crescimento da cultura com e sem o efeito de OE.

Os ensaios de crescimento decorreram durante pelo menos 20 dias, a uma temperatura constante e no escuro, com as placas invertidas. No caso de *P. chlamydospora* e de *A. mellea* a temperatura utilizada foi de 30 °C e para *B. cinerea* foi de 25 °C. Semanalmente foram captadas fotografias (usando sempre a mesma máquina, Cannon 700D, resolução, distância e posicionamento das placas) para avaliar o crescimento micelar, em diâmetro (mm), da colónia. A captação das fotografias foi feita pelo menos uma vez por semana.

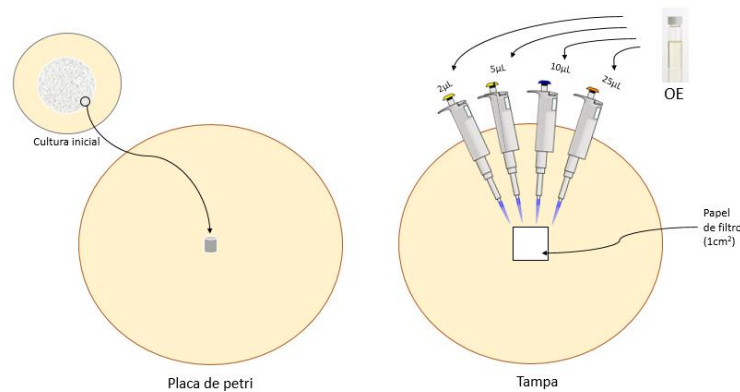


Figura 9 - Esquema do método usado para avaliação da inibição do crescimento micelar.

### 2.2.2. Testes da inibição do crescimento micelar com Mekzol

Paralelamente aos ensaios de inibição de crescimento do micélio do fungo com OE, testou-se o efeito de um produto antifúngico sintético, o Mekzol, já comercializado e usado em sobreiros. Este produto é usado para limpeza e desinfecção de ferramentas de descortiçamento e poda de sobreiros, criada pelo CTCOR – Centro Tecnológico de Cortiça e a empresa “Frosch Chemie”. Visa substituir o método até então usado, que consistia em imersão da lâmina do machado em álcool, formol ou água oxigenada (pontual). Apresenta-se como um biocida de amplo espectro de atuação, adaptado a uma utilização em rotina de limpeza e desinfecção *in situ* por pulverização das ferramentas de corte, com as seguintes

características: a) Produto estabilizado em base aquosa, garantindo uma aplicação fácil e inócua; b) Não corrosivo, preservando a integridade das lâminas e /ou serras das ferramentas de corte; c) Elevado poder desincrustante, facilitando deste modo a ação de limpeza; d) Incorporação na sua formação de ceras e polímeros de peso molecular médio, permitindo uma adequada e prolongada fixação dos ingredientes ativos nas superfícies de corte a desinfetar.

Este produto foi usado com o objetivo de comparação versus os óleos essenciais, exatamente nas mesmas condições e quantidades. Pretende-se perceber se poderá ser usado como desinfetante de tesouras de poda usadas na colheita das uvas/poda das videiras.

### 2.2.3. Teste da inibição da germinação de esporos de *B. cinerea*

Em culturas de *Botrytis cinerea*, com a idade de 15 dias, foi colocada água estéril (10 mL). As placas foram raspadas e as soluções obtidas foram posteriormente filtradas com gaze esterilizada, para se obter uma solução contendo exclusivamente esporos. Estes esporos foram depois contados com a ajuda de um hemocitómetro, ao microscópio, para determinar o número de esporos por volume de meio, e a solução foi conservada a -20 °C.

De seguida, 100 µL da suspensão de esporos foi inoculada em meio líquido de batata (PDA sem agar, PD), em tubos “ependorf”, juntamente com várias concentrações (Figura10):

- No caso dos OEs de *C. zeylanicum*, OE de *P. ruderales* foram testados 0,2 µL, 0,5 µL e 1 µL;
- O eugenol foi dissolvido em álcool 70 % para se obter um volume final de aproximadamente  $2 \times 10^{-5}$  µL/mL, do qual foram retiradas e testadas as mesmas quantidades que no caso dos ensaios com os OE, 0,2 µL, 0,5 µL e 1 µL, de forma a haver uma uniformização de processos;
- O eugenol encapsulado em micropartículas foi gentilmente cedido pela LEPABE, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto. As micropartículas encontravam-se revestidas em acetato de etilo, com 0,10 mg de eugenol/mg de nanopartícula. As micropartículas foram suspensas em *Zemea*®, um solvente, que ao contrário da água, permite que as micropartículas não se agreguem e assim

tornar a suspensão mais homogênea. Testaram-se as quantidades 0,2 µL, 0,5 µL e 1µL, de uma suspensão de 1 mL de *Zemea*® e 1 mg de micropartículas;

Realizaram-se 3 réplicas para cada concentração de OE e eugenol (puro e encapsulado) testada e ainda controlos apenas com a suspensão de esporos, para avaliação da germinação em condições ótimas de crescimento. Para perceber se o *Zemea*® influencia de alguma forma o desenvolvimento dos esporos foram feitos controlos só com este e em conjunto com a suspensão de esporos.

De seguida, os tubos “ependorf” foram selados com e parafilme para evitar a perda de compostos dos OEs, por evaporação, e mantidos a 25 °C. Retiraram-se amostras às 12 h, 24 h e 48 h seguintes à inoculação para avaliação do número de esporos germinados. Foram contabilizados como germinados os esporos que apresentavam um tubo germinativo de tamanho igual ou superior ao esporo.

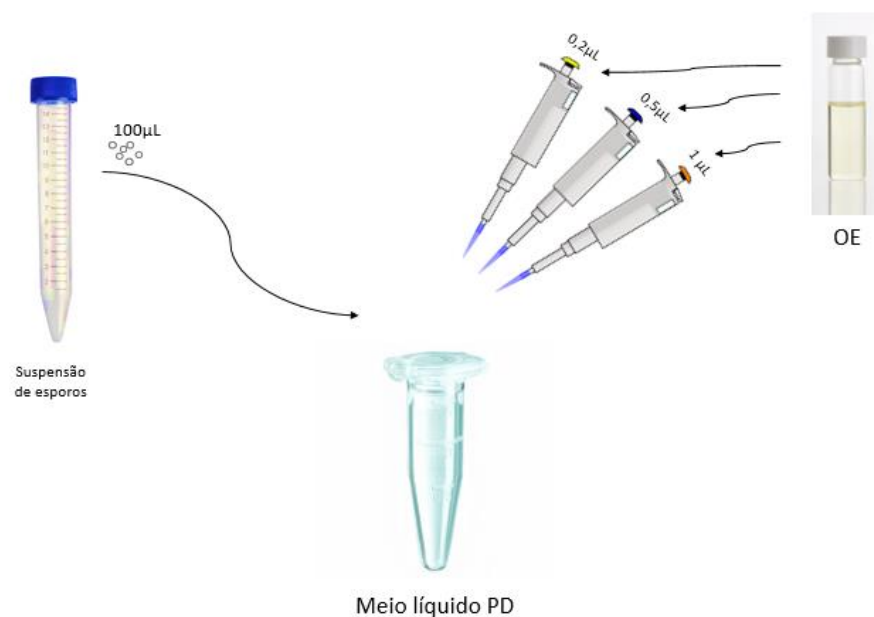


Figura 10 - Esquema do método usado para avaliação da inibição da germinação de esporos.

A evolução do desenvolvimento e germinação de esporos de *B. cinerea* foi feita através de captação de imagens de amostras recolhidas. Recorrendo ao Microscópio de Fluorescência “Leica” (modelo DM5000B+CTR5000+ebq100), foram observadas e recolhidas fotografias para contagem de esporos, germinados ou não.

Posteriormente fizeram-se contagens e medições do tamanho do tubo germinativo dos esporos com recurso ao programa “Image J”.

#### 2.2.4. Tratamento de dados e análise estatística

O tratamento dos dados foi executado usando o programa Graph Pad Prism 7 (Graph Pad Software, Inc., San Diego, CA,USA).

A inibição de crescimento micelar foi calculada usando a equação 1, em que  $D$  representa o diâmetro da colónia no último dia do ensaio.

$$\% \text{ inibição crescimento micelar} = \left( 1 - \frac{D \text{ com OE}}{D \text{ sem OE}} \right) \times 100 \quad [1]$$

O cálculo da percentagem de inibição da germinação dos esporos de *B. cinerea* (equação 2) surge da adaptação da equação 1:

$$\% \text{ inibição germinação} = \left( 1 - \frac{\% \text{ germinação com OE}}{\% \text{ germinação sem OE}} \right) \times 100 \quad [2]$$

Procedeu-se à comparação de resultados com recurso a uma Análise de Variância (ANOVA) de uma via, em que a comparação das médias foi feita pelo teste de Tukey. O nível de significância considerado foi  $\alpha=0.05$  ( $p \leq 0,05$ ).



### **3. Resultados e discussão**

---

### 3.1. Análise química dos óleos essenciais

A análise química dos OEs, feita através de cromatografia gasosa acoplada a um espectrómetro de massas (CG-MS), de *C. zeylanicum*, *C. nardus*, *M. alternifolia* e *T. mastichina*, foi anteriormente efetuada pelo Doutor Alberto Dias (CBMA - UM). O OE de *P. ruderale* foi extraído das folhas e analisado pela mesma técnica acima citada pelo Dr. Adilson Sartoratto (CPQBA/ Unicamp), e gentilmente cedido pela investigadora da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais e aluna de doutoramento Maira Fonseca.

Na Tabela 3 está identificada a abundância destes componentes (%), onde se consegue verificar diferenças entre os OE. A verde estão identificados os componentes maioritários de cada OE.

Tabela 3 – Componentes dos OEs de *C. zeylanicum*, *C. nardus*, *M. alternifolia*, *T. mastichina* e *P. ruderale*.

Componentes	<i>C. zeylanicum</i>	<i>C. nardus</i>	<i>M. alternifolia</i>	<i>T. mastichina</i>	<i>P. ruderale</i>
	%	%	%	%	%
1,8-cineol	-	0,75	4,2	42,78	-
Acetato de citranelol	-	1,87	-	-	-
Acetato de geraniol	3,21	-	-	-	-
Benzoato de benzilo	-	0,31	-	-	-
Cadineno	-	-	-	-	-
Cadinol	-	2,75	-	4,25	-
Canfeno	0,31	-	-	1,45	-
Cânfora	-	-	-	1,5	-
Cinamaldeído	-	0,5	-	-	-
Cinamil-acetato	-	-	-	-	-
Cis-ocimeno	-	-	-	-	0,48
Citranelol	-	10,25	-	-	-
Citronelal	-	37,12	-	-	-
Elemol	3,5	-	-	1,85	-
Espatulenol	-	-	-	-	5,16
Eugenol	78	5,67	-	-	-
Geraniol	-	24,75	-	-	-
Germacrereno	4,25	-	-	-	-
Guaiol	-	-	-	-	-
Limoneno	0,3	0,75	-	-	2,10
Linanol	2,75	-	-	12,57	-

Componentes	<i>C. zeylanicum</i>	<i>C. nardus</i>	<i>M. alternifolia</i>	<i>T. mastichina</i>	<i>P. ruderale</i>
	%	%	%	%	%
Mirceno	0,87	-	-	1,75	-
Mircenol	-	-	-	9,58	-
Neral	-	6,25	-	-	-
P-cimeno	1	-	4,75	-	-
Sabineno	-	-	-	-	1,62
Terpineno-4-ol	-	-	42,75	-	-
Trans - ocimeno	-	-	-	-	75,02
Y-terpineno	-	-	18,56	-	-
$\alpha$ -terpineol	-	2	3,5	9	-
$\alpha$ -terpinoleno	-	-	2,97	-	-
$\alpha$ -felandreno	0,55	-	-	-	-
$\alpha$ -terpineno	-	1,5	7,5	-	-
$\alpha$ -terpineno	-	-	-	-	-
$\beta$ -cariofileno	-	1,35	-	-	-
$\beta$ -eudesmol	-	0,96	-	-	-
$\beta$ -pineno	0,22	-	-	5,35	9,36
$\beta$ -elemeno	1	-	-	-	-
<b>% Total</b>	<b>96,71</b>	<b>98,28</b>	<b>87,9</b>	<b>93,18</b>	<b>87,92</b>

O OE de *C. zeylanicum* tem como componente principal o eugenol, que representa 78 % dos constituintes totais do OE. O eugenol é já descrito como principal constituinte. S. Combrinck et al., num estudo em que analisa a composição de 18 OE extraídos de diferentes plantas, por GC-MS, observa que o eugenol é o componente principal do OE de *C. zeylanicum*, com um total de 81,2 % [95].

No caso de *C. nardus*, observa-se que os principais componentes são o citranelal (37,12 %), o geraniol (24,75 %) e o citranelol (10,25 %). Esta análise vai de encontro ao reportado por Toledo et al., que identifica os principais componentes como sendo o citranelal (27,87 %), seguido por geraniol (22,77 %), geranial (14,54 %) e citranelol (11,85 %) [79].

Quanto a *M. alternifolia*, o seu componente maioritário é o terpineno-4-ol (42,75 %), seguido por Y-terpineno (18,56 %). Segundo a Organização Internacional de Normalização, ISO, o OE de *M. alternifolia* deve conter entre 30 a 48 % de terpineno-4-ol e de 10 a 28 % de Y-terpineno, valores que se assemelham à presente análise quantitativa e qualitativa do OE [81].

O OE de *T. mastichina* tem 1,8-cineol (42,78 %) e linanol (12,57 %) como seus componentes maioritários [90]. L. R. Salgueiro et al., publicou em 1997 um estudo que compara a composição de OEs diferentes populações de *Thymus*, em que *Thymus mastichina* apresenta como componente maioritários o 1,8-cineol (53,3 %) e o linanol (5,5 %) [91].

O OE extraído de *P. ruderale* tem como componentes maioritários o trans-ocimeno (75,02 %), o  $\beta$ -pineno (9,36 %) e o espatulenol (5,16 %). Fonseca et al. identificou em 2016 os componentes presentes principais encontrados no OE de *P. ruderale*, extraídos das folhas ou flores da planta, colhidas em diferentes alturas de desenvolvimento da planta. Concluiu que para OEs extraídos das folhas um dos dois componentes maioritários são o trans-ocimeno e o  $\beta$ -pineno, com valores que variam conforme a altura a colheita [96].

### **3.2. Avaliação da atividade antifúngica**

#### Inibição do crescimento micelar por ação de óleos essenciais

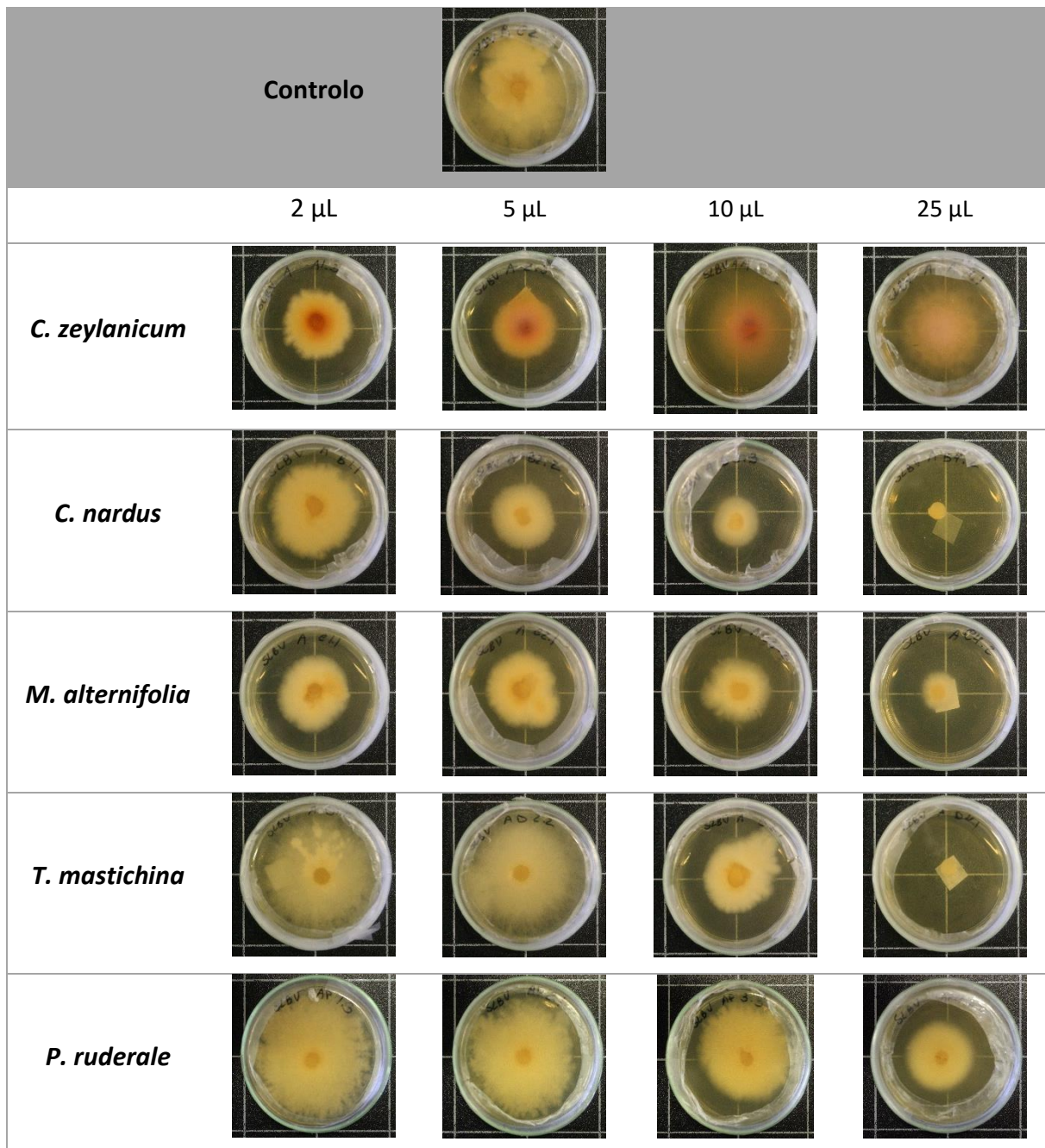
O crescimento micelar de cada placa foi registado através de fotografias ao longo dos dias de incubação e posteriormente foi medido o diâmetro da cultura de cada réplica com recurso ao programa “Image J” [97].

Nas tabelas 4, 5 e 6 estão apresentadas fotografias do controlo de uma das três réplicas de cada quantidade de OE, das diferentes espécies fúngicas, no último dia do ensaio.

#### **a) Inibição do crescimento micelar de *A. mellea***

Na Tabela 4 encontram-se fotografias que mostram o desenvolvimento das culturas de *A. mellea*, crescendo em contacto com os OEs de *C. zeylanicum*, *C. nardus*, *M. alternifolia*, *T. mastichina* e *P. ruderale*, nas quantidades 2  $\mu$ L, 5  $\mu$ L, 10  $\mu$ L e 25  $\mu$ L versus o controlo, no final do ensaio. Para cada OE escolheu-se uma fotografia de uma das réplicas para cada quantidade aplicada.

Tabela 4 - Comparação do efeito de cinco OE (*C. zeylanicum*, *C. nardus*, *M. alternifolia*, *T. mastichina*, *P. ruderale*) em diferentes quantidades (2  $\mu$ L, 5  $\mu$ L, 10  $\mu$ L e 25  $\mu$ L) no crescimento micelar em *Armillaria mellea* no final do ensaio.



Os seguintes gráficos (Figuras 11-15) mostram o desenvolvimento de *A. mellea* em contacto com os diferentes OE versus o controlo. Em cada gráfico observam-se as curvas de crescimento, que resultam da medição do diâmetro (mm) do micélio do fungo desta espécie. Consegue-se, assim, perceber de forma simples qual foi o comportamento do fungo ao longo do período de incubação.

#### Crescimento micelar de *A. mellea* com OE *C. zeylanicum*

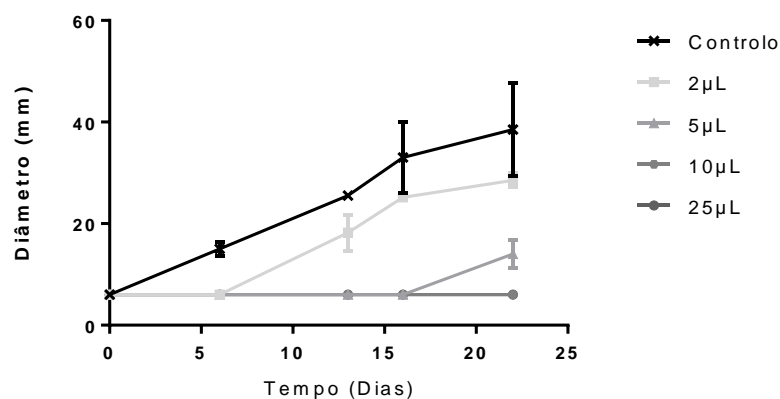


Figura 11 - Crescimento micelar (mm) de *A. mellea* em contato com OE de *C. zeylanicum* nas quantidades 2 µL, 5 µL, 10 µL e 25 µL ao longo do ensaio.

O OE de *C. zeylanicum*, na quantidade mais baixa de OE, 2 µL, provoca uma fase de adaptação maior que a do controlo, mais 7 dias, atingindo a colónia um diâmetro de 29 mm, após 15 dias de crescimento. Na quantidade de 5 µL de OE, o crescimento só aconteceu no final do ensaio, atingindo em média 18 mm de diâmetro, este acontecimento sugere que pode ter havido fuga do OE com o tempo decorrido ou perda da capacidade deste. Nas concentrações mais altas, 10 µL e 25 µL, a cultura não se desenvolve da mesma forma; não apresenta crescimento micelar, mas exibe uma auréola branca em volta do disco de *A. mellea* inoculado, que poderá representar a reação do OE com o próprio meio de cultura.

#### Crescimento micelar de *A. mellea* com OE *C. nardus*

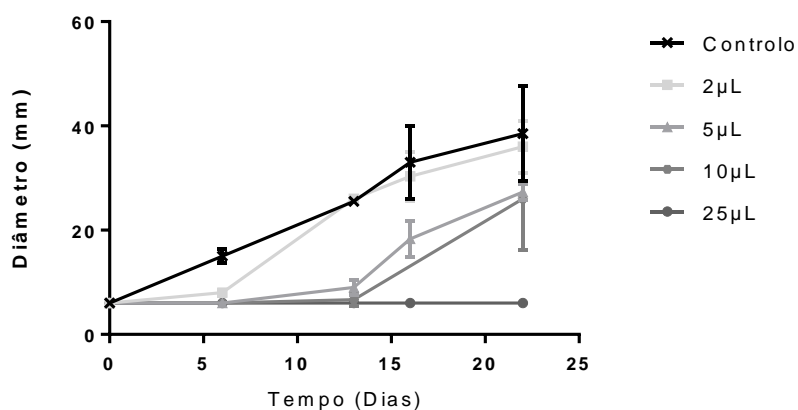


Figura 12- Crescimento micelar (mm) de *A. mellea* em contato com OE de *C. nardus* nas quantidades 2 µL, 5 µL, 10 µL e 25 µL ao longo do ensaio.

No caso do OE de *C. nardus*, quando aplicados 2  $\mu$ L, o micélio do fungo alcança uma média de 36 mm de diâmetro, com 5  $\mu$ L chega aos 27 mm e com 10  $\mu$ L apenas cresce em média 19 mm. Tendo em conta que o controlo atinge 38mm foi visível uma diminuição do desenvolvimento do fungo quanto maior foi a quantidade de OE aplicado.

Crescimento micelar de *A. mellea* com EO *M. alternifolia*

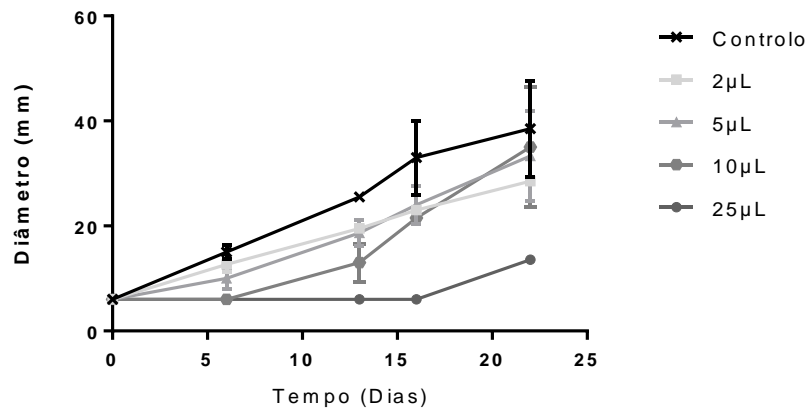


Figura 13– Crescimento micelar (mm) de *A. mellea* em contato com OE de *M. alternifolia* nas quantidades 2  $\mu$ L, 5  $\mu$ L, 10  $\mu$ L e 25  $\mu$ L ao longo do ensaio.

Aplicando o OE de *M. alternifolia*, apenas é notória uma ação antifúngica na maior quantidade de OE aplicado, 25  $\mu$ L. Mas houve alguma diferença entre o crescimento da cultura de controlo, 38 mm, e das restantes em contacto com o OE - 2  $\mu$ L com 37 mm, 5  $\mu$ L com 33 mm e 10  $\mu$ L com apenas 11 mm. De salientar, ainda, que na maior quantidade só acontece desenvolvimento do micélio no final do ensaio.

Crescimento micelar de *A. mellea* com OE *T. mastichina*

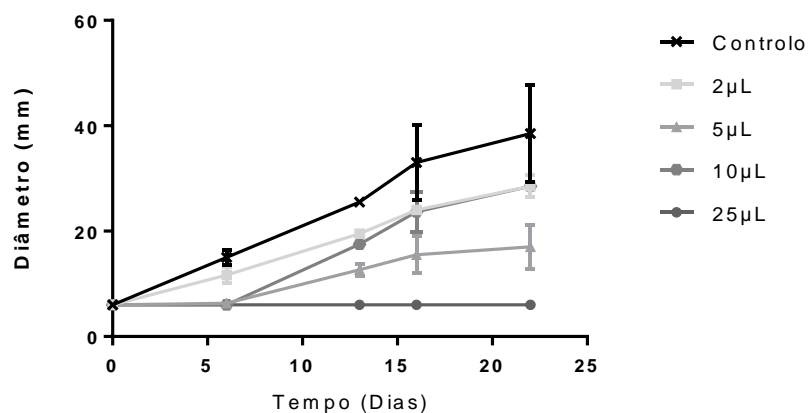


Figura 14 - Crescimento micelar (mm) de *A. mellea* em contato com OE de *T. mastichina* nas quantidades 2  $\mu$ L, 5  $\mu$ L, 10  $\mu$ L e 25  $\mu$ L ao longo do ensaio.

Em relação ao OE de *T. mastichina*, verifica-se uma diminuição do desenvolvimento da cultura em relação ao controlo, tendo em conta que o micélio alcança uma média de 38 mm de diâmetro, sendo que no caso das réplicas com menor quantidade de OE aplicado, 2  $\mu\text{L}$ , atinge 35 mm, nas com 5  $\mu\text{L}$  chega aos 28mm, com 10  $\mu\text{L}$  cresce uma média de 32 mm, e no caso de 25  $\mu\text{L}$  apenas chega aos 10 mm de diâmetro.

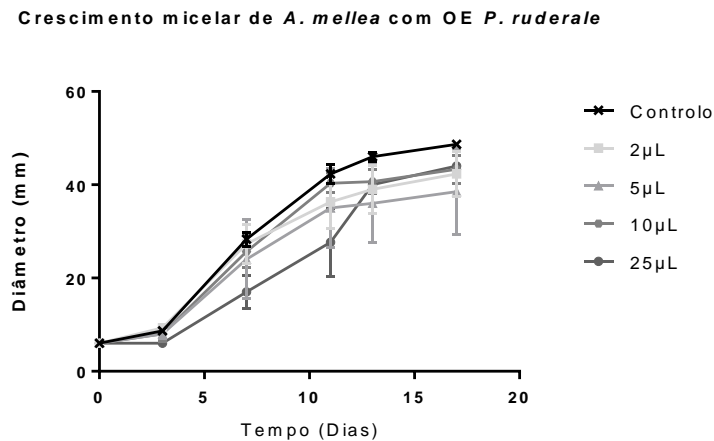


Figura 15 - Crescimento micelar (mm) de *A. mellea* em contato com OE de *P. ruderale* nas quantidades 2  $\mu\text{L}$ , 5  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{L}$  e 25  $\mu\text{L}$  ao longo do ensaio.

Já o OE de *P. ruderale* não apresenta diferenças significativas observáveis no desenvolvimento da cultura. O controlo chega a uma média de 48 mm, as réplicas das quantidades 2  $\mu\text{L}$ , 5  $\mu\text{L}$  e 10  $\mu\text{L}$  chegam a um diâmetro idêntico – 42, 44 e 43, respetivamente – e as culturas onde foi aplicada a quantidade mais elevada, 25  $\mu\text{L}$ , cresce em média 34 mm.

De forma a ficar mais clara a interpretação do efeito dos OE, é calculada a percentagem de inibição para cada quantidade (Figura 16) ao 13º dia, dia em que ainda se verifica crescimento também do controlo. A análise estatística revela as semelhanças e diferenças das diferentes quantidades dos diferentes OE *versus* o controlo.



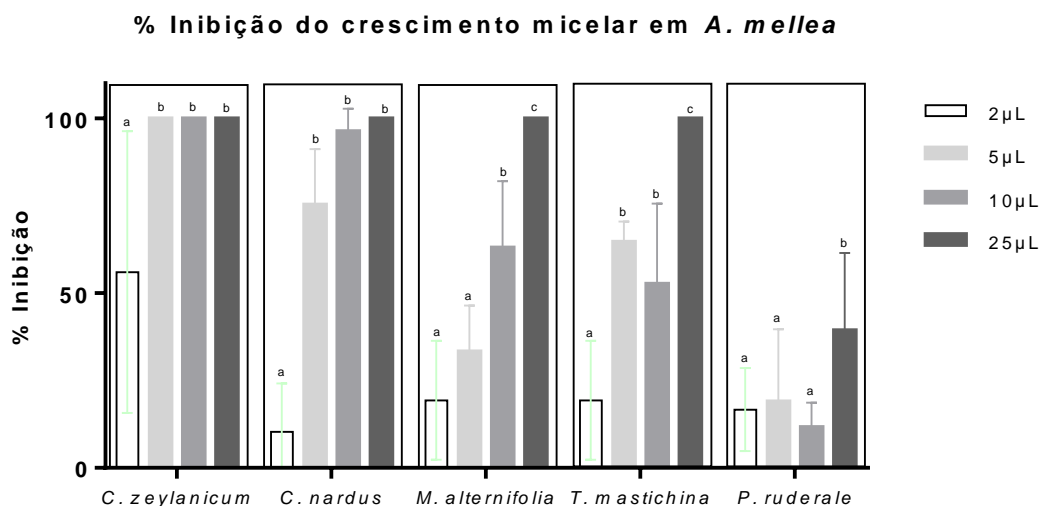


Figura 16 - Percentagem de inibição do crescimento micelar de *A. mellea* em contato com OE de *C. zeylanicum*, OE de *C. nardus*, OE de *M. alternifolia*, OE de *T. mastichina* e OE de *P. ruderales* em diferentes quantidades (2 µL, 5 µL, 10 µL e 25 µL) no 13º dia de ensaio.

O OE de *C. zeylanicum*, para a quantidade de 2µL de OE apresenta uma percentagem de inibição de cerca de 56 %. Para as restantes quantidades chega a 100 % de inibição do crescimento do micélio. A análise estatística indica que há diferenças significativas entre os 2 µL e as restantes quantidades aplicadas, sendo que estas são idênticas entre si. Isto quer dizer que o OE provoca 100 % de inibição do crescimento micelar de *A. mellea* quando aplicado em quantidades superiores a 5 µL. Este OE foi o que apresentou melhores resultados na inibição do crescimento micelar em *A. mellea*, demonstrando o seu efeito antifúngico já provado para outras espécies [98].

O OE de *C. nardus* apenas apresenta inibição do crescimento micelar de *A. mellea* quando aplicados 25 µL de OE, onde a inibição do crescimento é de 100 %. Em relação à análise estatística, a quantidade aplicada de 2 µL é estatisticamente diferente em relação às restantes quantidades, sendo que estas não apresentam diferenças entre si. Para que o efeito do OE seja satisfatório devem ser aplicadas quantidades acima de 5 µL, já que a partir desta quantidade há uma inibição do crescimento micelar superior a 50 %.

Quanto ao OE de *M. alternifolia*, a ação antifúngica é de quase 100 %, quando aplicados 25 µL. A análise estatística revela que 2 µL não apresenta diferenças significativas com a quantidade 5 µL, mas 10 µL e 25 µL exibem diferenças significativas entre si e em relação às restantes quantidades testadas.

Em relação ao OE de *T. mastichina*, há uma tendência para o aumento da inibição do crescimento com o aumento da quantidade de OE aplicado. Este resultado está em concordância com Anzlovar *et al.*, que verificou que o efeito antifúngico do OE de *Thymus vulgaris* L. em contacto *A. mellea*, num método similar ao utilizado neste ensaio, só tem efeito numa concentração de 10 % (dissolvido em etanol) de OE [99]. Estatisticamente, há diferenças significativas entre 2 µL e 25 µL e as restantes quantidades. Já 5 µL e 10 µL apresentam-se como idênticos.

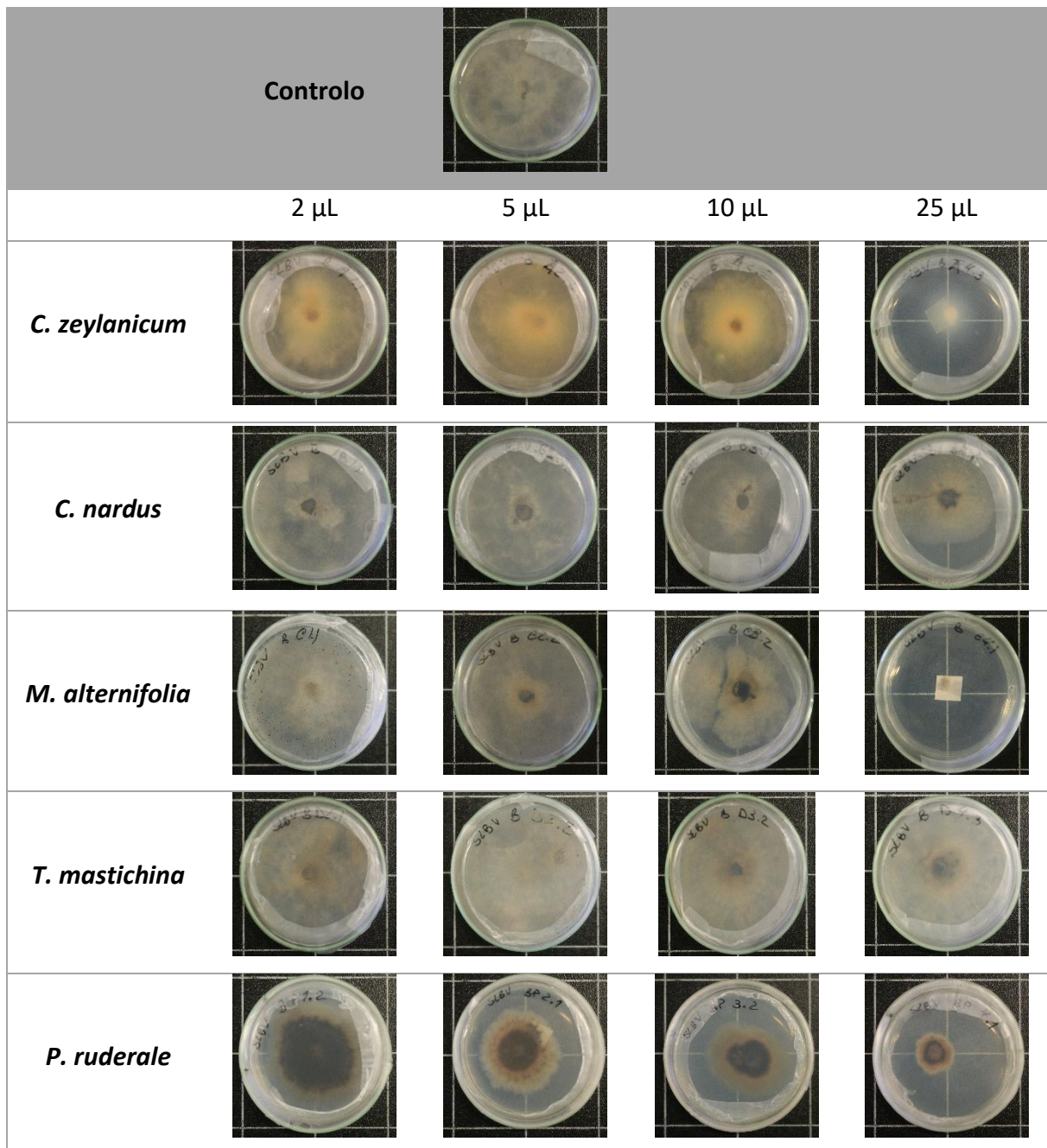
Já o OE de *P. ruderale* não se mostra eficiente em nenhuma das quantidades aplicadas. Mesmo na maior quantidade, 25 µL, apenas consegue uma inibição de 32 %. Concluindo, não há diferenças significativas entre o as 2 µL, 5 µL e 10 µL, verificando-se o oposto em relação a 25 µL. Comparando com os outros quatro OE utilizados é o que menos se destaca como possível candidato a ser aplicado ao combate de *A. mellea*. Numa análise geral, pode-se verificar o efeito que cada quantidade de OE tem sobre *A. mellea*. Na generalidade nenhum OE apresenta inibição do crescimento micelar nas quatro quantidades, embora haja um abrandamento do desenvolvimento da colónia quanto maior for a quantidade de OE aplicado.

Três dos cinco OE testados – *C. zeylanicum*, *C. nardus* e *T. mastichina* – apresentaram-se como um impedimento ao desenvolvimento do fungo, tendo *C. zeylanicum* se destacado-se mais numa fase inicial, provocando inibição para quantidades superiores a 5 µL. Os outros dois OE em quantidade mais elevadas (25 µL).

#### **b) Inibição do crescimento micelar de *B. cinerea***

Na Tabela 5 podem-se observar fotografias de amostras representativas do desenvolvimento das culturas de *B. cinerea* em contacto com os cinco OEs – *C. zeylanicum*, *C. nardus*, *M. alternifolia*, *T. mastichina* e *P. ruderale* - aplicados nas quantidades 2 µ, 5 µL, 10 µL e 25 µL, em comparação com o controlo, no último dia do ensaio.

Tabela 5 - Comparação do efeito de cinco OE (*C. zeylanicum*, *C. nardus*, *M. alternifolia*, *T. mastichina*, *P. ruderale*) em diferentes quantidades (2  $\mu$ L, 5  $\mu$ L, 10  $\mu$ L e 25  $\mu$ L) no crescimento micelar em *Botrytis cinerea* no final do ensaio.



A evolução do crescimento em *B. cinerea* (em diâmetro), durante todo o período do ensaio, está representada nas Figuras 17-21.

Crescimento micelar de *B. cinerea* com OE *C. zeylanicum*

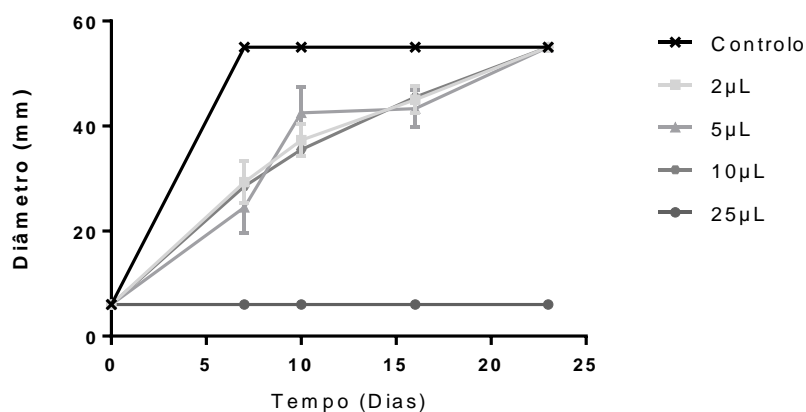


Figura 17 - Crescimento micelar (mm) de *B. cinerea* em contato com OE de *C. zeylanicum* nas quantidades 2 µL, 5 µL, 10 µL e 25 µL ao longo do ensaio.

Quando em contacto com as quantidades 2 µL e 5 µL de OE de *C. zeylanicum*, o desenvolvimento de *B. cinerea* não foi afetado, atingindo uma média de 55 mm de diâmetro, assim como o controlo. No caso das réplicas com 10 µL, o diâmetro fica-se pelos 39 mm e com 25 µL não se verifica qualquer crescimento da cultura. Pode-se concluir que o efeito começa a ser inibitório entre os 10 µL e 25 µL de OE aplicado.

Crescimento micelar de *B. cinerea* com OE *C. nardus*

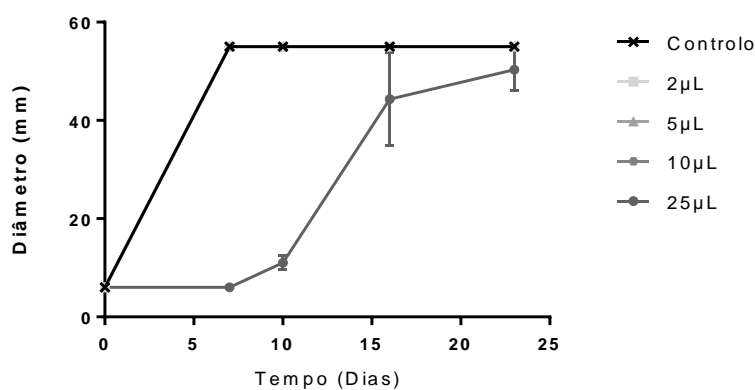


Figura 18 - Crescimento micelar (mm) de *B. cinerea* em contato com OE de *C. nardus* nas quantidades 2 µL, 5 µL, 10 µL e 25 µL ao longo do ensaio.

O OE se *C. nardus*, aplicado nas quantidades 2 µL, 5 µL e 10 µL, não interfere no desenvolvimento de *B. cinerea*. O micélio atinge 55 mm de diâmetro, no mesmo intervalo de tempo do controlo. Já no caso dos 25 µL, há um crescimento mais lento do micélio do fungo,

que ao fim de 23 dias atinge uma média de 50 mm de diâmetro. Verifica-se, portanto, que nenhuma das quantidades de OE de *C. nardus* é suficiente para inibir o crescimento micelar de *B. cinerea*.

Crescimento micelar de *B. cinerea* com OE *M. alternifolia*

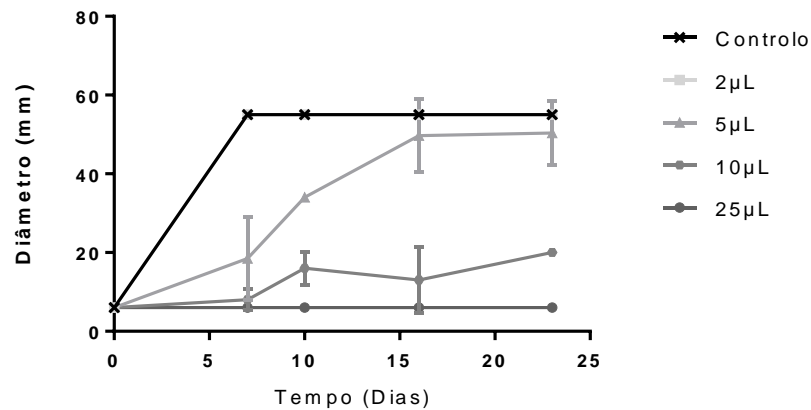


Figura 19 - Crescimento micelar (mm) de *B. cinerea* em contato com OE de *M. alternifolia* nas 2 µL, 5 µL, 10 µL e 25 µL ao longo do ensaio.

*B. cinerea* em contacto com 2 µL de OE de *M. alternifolia* não apresenta um comportamento diferente em relação ao controlo. Mas, com 5 µL, já que aparenta abrandar o crescimento da cultura, mas que também chega depois aos 55 mm de diâmetro. No caso de aplicados 10 µL, a cultura apenas atinge 27 mm de diâmetro, é, portanto, mais eficaz a partir desta quantidade. Na maior quantidade aplicada, 25 µL, a cultura não se desenvolve por completo, havendo inibição do crescimento micelar de *B. cinerea*.

Crescimento micelar de *B. cinerea* com OE *T. mastichina*

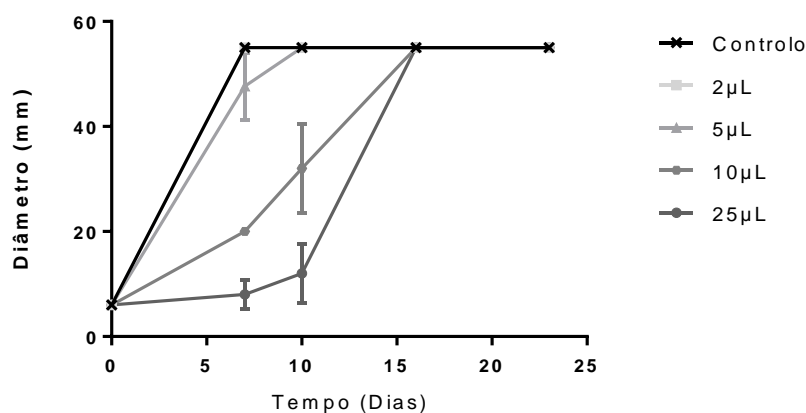


Figura 20 - Crescimento micelar (mm) de *B. cinerea* em contato com OE de *T. mastichina* nas quantidades 2 µL, 5 µL, 10 µL e 25 µL ao longo do ensaio.

Com o OE de *T. mastichina*, em todas as quantidades à exceção de 2  $\mu\text{L}$ , verifica-se que o crescimento micelar de *B. cinerea* abranda em relação ao controlo. Ao 10<sup>o</sup> dia de ensaio, os fungos em contacto com 10  $\mu\text{L}$  de OE atingem em média 39 mm de diâmetro, e no caso dos 25  $\mu\text{L}$  de OE chegam apenas a 19 mm de diâmetro. Só ao fim de 16 dias os fungos das réplicas com 10  $\mu\text{L}$  e 25  $\mu\text{L}$  de OE de *T. mastichina* atingem o cumprimento máximo do micélio, com 55mm de diâmetro.

Crescimento micelar de *B. cinerea* com OE *P. ruderale*

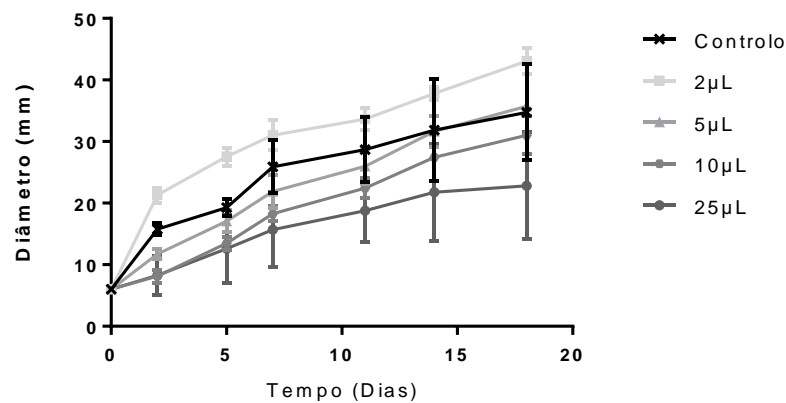


Figura 21 - Crescimento micelar (mm) de *B. cinerea* em contato com OE de *P. ruderale* nas quantidades 2  $\mu\text{L}$ , 5  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{L}$  e 25  $\mu\text{L}$  ao longo do ensaio.

O crescimento de *B. cinerea* quando em contato com o OE de *P. ruderale*, apenas se diferencia mais do controlo quando aplicado nas quantidades 10  $\mu\text{L}$  e 25  $\mu\text{L}$ , atingindo 23 mm e 17 mm de diâmetro, respetivamente. Em contato com a quantidade aplicada de 2  $\mu\text{L}$ , o micélio do fungo cresce mais em diâmetro do que o próprio controlo, o que quer dizer que este não é afetado pelo OE. Nas restantes quantidades, há um desenvolvimento menor do *B. cinerea*, que no final do ensaio tem uma média diâmetro do micélio inferior ao controlo.

Na Figura 22 está representada a percentagem de inibição aos 7 dias de ensaio, altura em que o controlo também se encontrava em fase de crescimento, e a respetiva análise estatística.

### % Inibição em *B. cinerea*

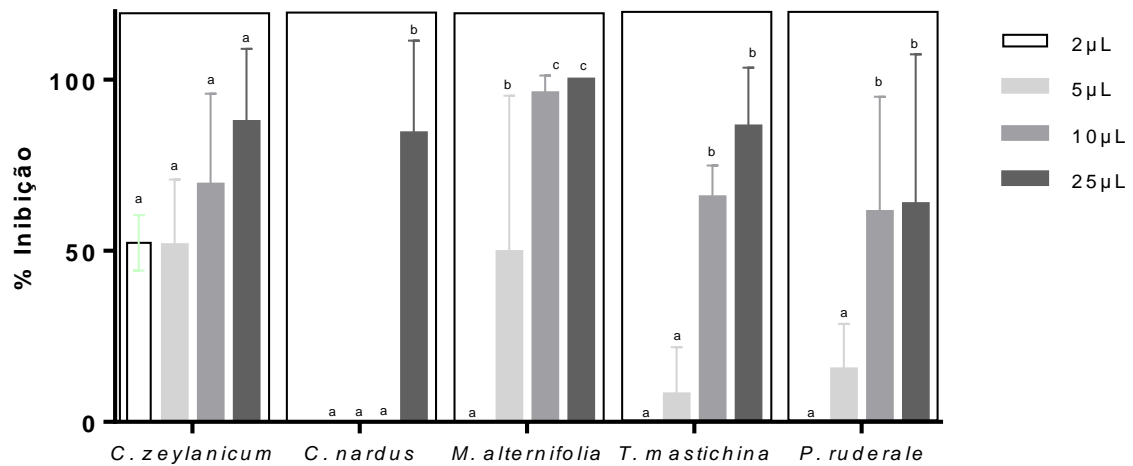


Figura 22 - Percentagem de inibição do crescimento de *B. cinerea* em contato com OE de *C. zeylanicum*, OE de *C. nardus*, OE de *M. alternifolia*, OE de *T. mastichina* e OE de *P. ruderales* em diferentes quantidades (2 µL, 5 µL, 10 µL e 25 µL) no 7º dia do ensaio.

Mesmo aplicado na quantidade mais pequena (2 µL), o OE de *C. zeylanicum* provoca uma inibição do crescimento micelar de *B. cinerea* de 52 %. Na literatura, um estudo com ácido cinamónico (AC), um ácido orgânico isolado a partir do tronco de *C. zeylanicum*, em que foram aplicadas diferentes concentrações no meio de cultura (0; 0,5; 1; 2,5; 5 e 10 mM), verifica-se que só a maior concentração de AC teve um efeito de 100 % na inibição do crescimento de *B. cinerea* [100]. Para nenhuma das quantidades se verifica uma inibição superior a 88%. Estatisticamente, aos 7 dias de ensaio há diferenças significativas entre o controlo e todas as quantidades de OE aplicadas, mas todas estas são idênticas entre si. Assim como verificado em *A. mellea*, também o meio de cultura sofreu alterações por contacto com o OE de *C. zeylanicum*.

Quando em contacto como OE *C. nardus*, *B. cinerea* não exhibe diferenças notórias em relação ao controlo, exceto quando aplicados 25µL de OE, que provoca uma inibição de 84 % ao fim de 7 dias. Num estudo realizado para testar a inibição da germinação de esporos de *B. cinerea*, testando as concentrações 100 %, 50 %, 25 %, 12,5 %, 6,25 %, 3,13 %, 1,56 %, 0,78 % e 0,39 %, verifica-se a inibição da germinação a partir de 6,25 % de OE de *C. nardus* aplicado [101]. O controlo é idêntico às quantidades 2 µL, 5 µL e 10 µL, e estas são idênticas entre si, mas significativamente diferente da quantidade de 25 µL de OE. Como se verifica uma diferença tão grande na inibição do crescimento entre a aplicação de 10 µL e

de 25 µL no futuro seria relevante testar quantidades entre estas duas para se perceber com mais certeza a partir de que quantidade o efeito antifúngico se começa a manifestar.

Aplicando 25 µL de OE de *M. alternifolia*, o crescimento micelar de *B. cinerea* é inibido a 100 %. O controlo é idêntico à quantidade de 2 µL aplicada e estes são significativamente diferentes das outras três quantidades, da qual só 5 µL apresenta diferenças.

O OE de *Thymus vulgaris* tem sido bastante testado para o controlo de *B. cinerea*, nem sempre com os resultados pretendidos. Neste caso foi usado o OE de uma espécie de *Thymus* diferente, autóctone Algarvia, *Thymus mastichina*. Esta espécie nunca antes havia sido testado para a inibição do desenvolvimento de *B. cinerea*. Os resultados mostram-se em concordância com os obtidos por outros autores que testaram OE de *T. vulgaris* [102] [103]. Ao fim de 7 dias ainda se verifica uma inibição de 86 % no caso dos 25 µL, mas no final do ensaio esta inibição cai para os 0 %. Este é, portanto, o OE testado com menor efeito sobre *B. cinerea*. Quanto à análise estatística, o controlo é idêntico às quantidades 2 µL e 5 µL, significativamente diferentes das quantidades 10 µL e 25 µL, sendo que estas últimas não apresentam diferenças significativas.

Ao fim de 7 dias, a maior quantidade testada do OE de *P. ruderale* apenas provoca uma inibição do crescimento micelar de *B. cinerea* da ordem dos 60 %, mas é notório que o OE tem impacto na velocidade de crescimento da cultura. O controlo apresenta-se idêntico às quantidades de OE aplicadas de 2 µL e 5 µL, que têm diferenças significativas entre as quantidades 10 µL e 25 µL, que são idênticos entre si. Verifica-se diminuição do desenvolvimento do fungo quando aplicadas quantidades de OE superiores a 10 µL, embora a inibição se fique pelos 60 %, sendo que no futuro se poderia testar quantidades superiores a 25 µL de OE.



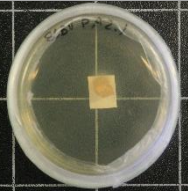
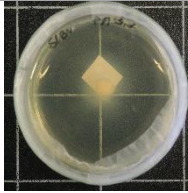
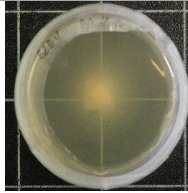


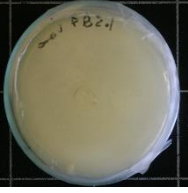

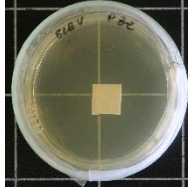


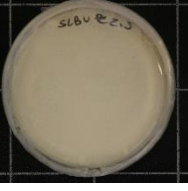

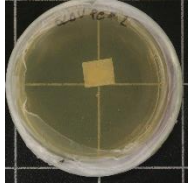




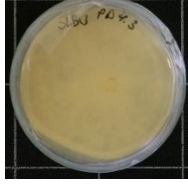


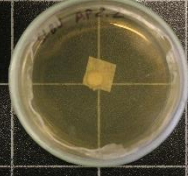
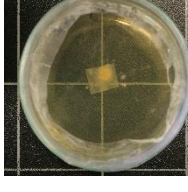
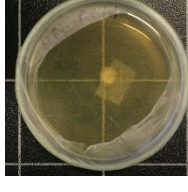
O crescimento vegetativo de *B. cinerea* apenas foi afetado completamente pela quantidade mais elevada (25 µL) de OE *M. alternifolia*. Já o abrandamento do crescimento, é mais visível nas colónias em contato com o OE de *P. ruderale* e com 25 µL de OE de *C. zeylanicum* e OE de *C. nardus*.



**c) Inibição do crescimento micelar de *P. chlamydospora***

Na Tabela 6 encontram-se representadas fotografias que evidenciam o desenvolvimento das culturas de *P. chlamydospora*, que cresceram em contacto com os OE de *C. zeylanicum*, *C. nardus*, *M. alternifolia*, *T. mastichina* e *P. ruderale*, nas quantidades 2  $\mu$ L, 5  $\mu$ L, 10  $\mu$ L e 25  $\mu$ L, no último dia do ensaio.

Tabela 6 - Comparação do efeito de cinco OE (*C. zeylanicum*, *C. nardus*, *M. alternifolia*, *T. mastichina*, *P. ruderale*) em diferentes quantidades (2  $\mu$ L, 5  $\mu$ L, 10  $\mu$ L e 25  $\mu$ L) no crescimento micelar em *Phaeoemoniella chlamydospora* no final do ensaio

	Controlo				
		2 $\mu$ L	5 $\mu$ L	10 $\mu$ L	25 $\mu$ L
<i>C. zeylanicum</i>					
<i>C. nardus</i>					
<i>M. alternifolia</i>					
<i>T. mastichina</i>					
<i>P. ruderale</i>					

Seguem as curvas de crescimento, representadas sob forma do diâmetro da cultura, de *P. chlamydospora* ao longo do ensaio, quando aplicado OE em comparação com o controlo (Figuras 23-27).

Crescimento micelar de *P. chlamydospora* com OE *C. zeylanicum*

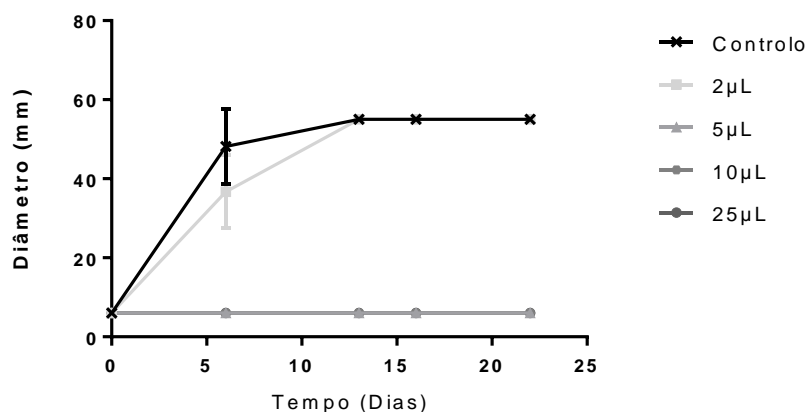


Figura 23 - Crescimento micelar (mm) de *P. chlamydospora* em contato com OE de *C. zeylanicum* nas quantidades 2 µL, 5 µL, 10 µL e 25 µL ao longo do ensaio.

Quando em contacto com o OE de *C. zeylanicum*, o crescimento micelar de *P. chlamydospora* apenas não foi inibido quando aplicados 2 µL de OE, com um desenvolvimento muito semelhante. As restantes quantidades, 5 µL, 10 µL e 25 µL, provocaram a total inibição do crescimento do micélio do fungo.

Crescimento micelar de *P. chlamydospora* com OE *C. nardus*

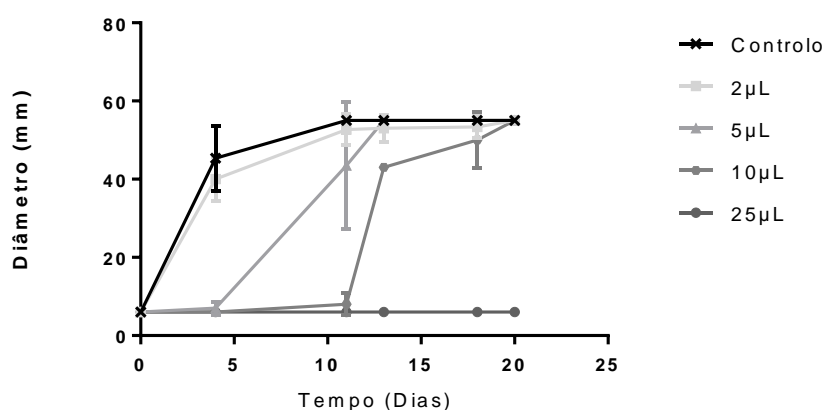


Figura 24 - Crescimento micelar (mm) de *P. chlamydospora* em contato com OE de *C. nardus* nas quantidades 2 µL, 5 µL, 10 µL e 25 µL ao longo do ensaio.

Apenas quando são aplicados 25  $\mu$ L de OE de *C. nardus*, o micélio de *P. chlamydospora* não apresenta desenvolvimento. Para as quantidades 5  $\mu$ L e 10  $\mu$ L de OE verifica-se um atraso no crescimento do micélio, mas este acaba por atingir os 55 mm de diâmetro tal como o controlo no final do ensaio. Conclui-se, então, que com as três quantidades mais baixas não há inibição do crescimento do fungo mas este sofre alterações no desenvolvimento e este demora pelo menos mais 7 dias a atingir o diâmetro máximo (55 mm).

Crescimento micelar de *P. chlamydospora* com OE *M. alternifolia*

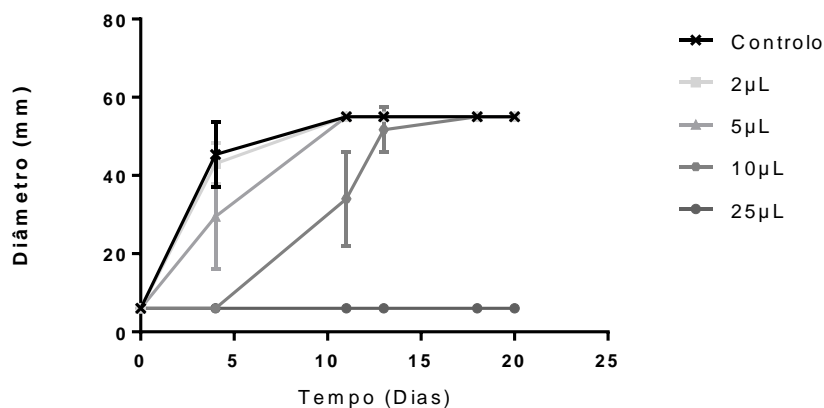


Figura 25 - Crescimento micelar (mm) de *P. chlamydospora* em contato com OE de *M. alternifolia* nas quantidades 2  $\mu$ L, 5  $\mu$ L, 10  $\mu$ L e 25  $\mu$ L ao longo do ensaio.

No caso de aplicados 2  $\mu$ L, 5  $\mu$ L e 10  $\mu$ L de OE de *M. alternifolia*, há um ligeiro atraso no crescimento micelar. Principalmente no caso de 10  $\mu$ L, verifica-se que só no 11º dia do ensaio é registado crescimento do fungo, com uma média de 34 mm de diâmetro. Mais uma vez verifica-se que apenas a quantidade mais elevada (25  $\mu$ L) de OE é eficaz na inibição total do crescimento micelar de *P. chlamydospora*.

Crescimento micelar de *P. chlamydospora* com OE *T. mastichina*

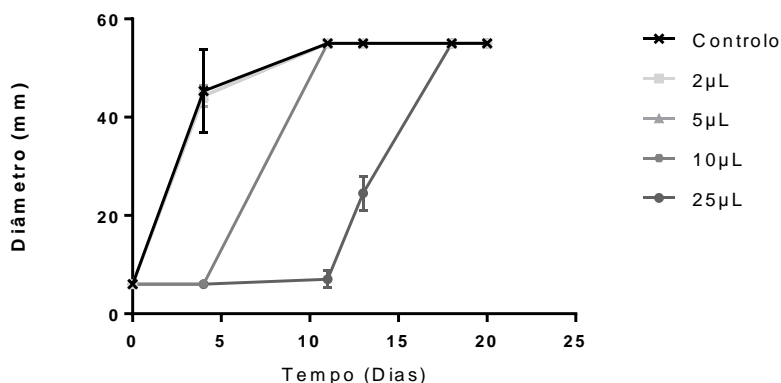


Figura 26 - Crescimento micelar (mm) de *P. chlamydospora* em contato com OE de *T. mastichina* nas quantidades 2 µL, 5 µL, 10 µL e 25 µL ao longo do ensaio.

O OE de *T. mastichina*, mesmo na quantidade mais alta, não apresenta efeito inibitório do crescimento de *P. chlamydospora*. A única diferença em relação ao controle acontece nos casos das quantidades 10 µL e ainda mais em 25 µL, que atrasam o desenvolvimento do micélio. Em contato com as duas menores quantidades, o fungo tem um comportamento idêntico ao controle.

Crescimento micelar de *P. chlamydospora* com OE *P. ruderale*

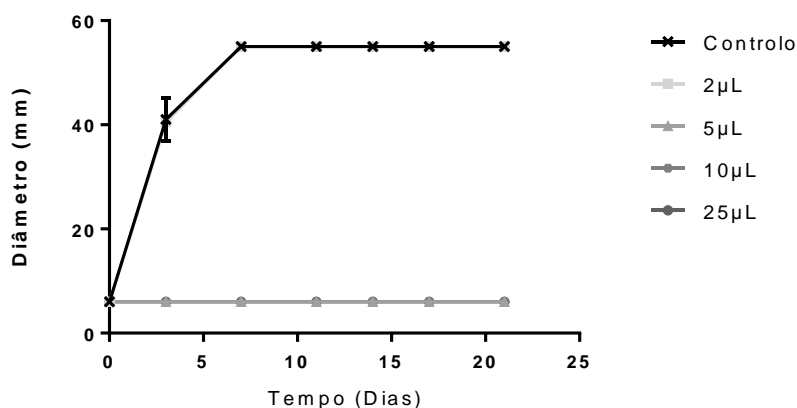


Figura 27 - Crescimento micelar (mm) de *P. chlamydospora* em contato com OE de *P. ruderale* nas quantidades 2 µL, 5 µL, 10 µL e 25 µL ao longo do ensaio.

Por fim, aplicados 2 µL OE de *P. ruderale*, o crescimento micelar de *P. chlamydospora* não é afetado, com uma velocidade de crescimento e diâmetro total praticamente nos mesmos valores do controle. Já para as restantes quantidades, 5 µL, 10 µL e 25 µL, o crescimento micelar é totalmente nulo para as quantidades.

No seguinte gráfico (Figura 28) pode ser observada a percentagem de inibição do crescimento de *P. chlamydospora* assim como os resultados da análise estatística ao fim de 4 dias de ensaio, altura em que o controlo também se encontrava em fase de crescimento.

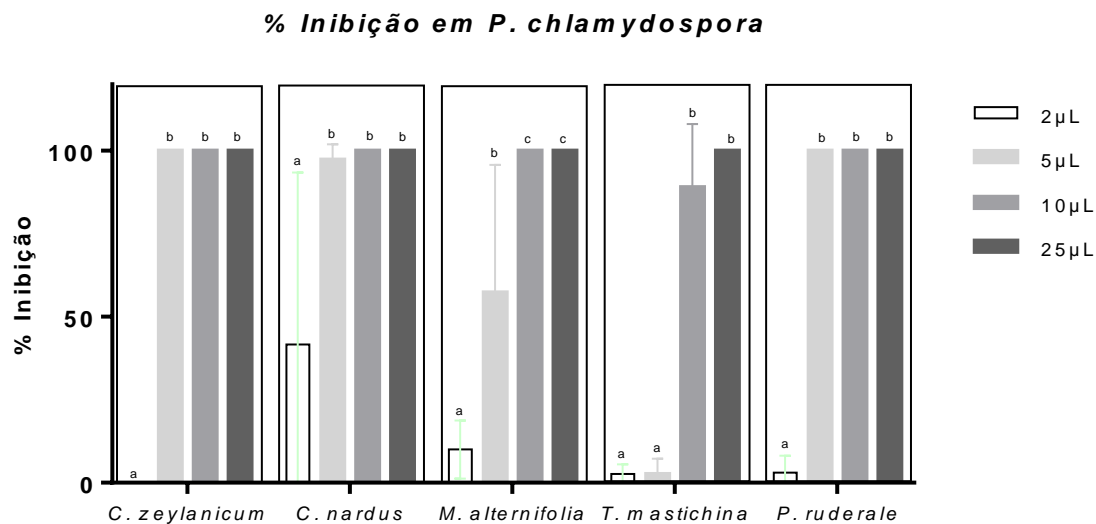


Figura 28 - Percentagem de inibição do crescimento de *P. chlamydospora* em contacto com OE de *C. zeylanicum*, OE de *C. nardus*, OE de *M. alternifolia*, OE de *T. mastichina* e OE de *P. ruderales* em diferentes quantidades (2 µL, 5 µL, 10 µL e 25 µL) ao 4º dia de ensaio.

*C. zeylanicum*, ao fim de 4 dias, apresenta uma percentagem de inibição de 100 % para todas as quantidades testadas, à exceção da mais baixa, 2 µL. Verifica-se que este efeito se mantém até ao final do ensaio, não havendo qualquer crescimento micelar das culturas em contacto com 5 µL, 10 µL e 25 µL de OE. Estatisticamente, o controlo e a quantidade 2 µL são idênticos, mas significativamente diferentes das restantes 3 quantidades de OE aplicado, que são idênticas entre si. Mais uma vez é perceptível o efeito do OE de canela sobre o meio de cultura. Este OE apresenta um bom poder de inibição do crescimento quando aplicados mais de 5 µL.

Quanto a *C. nardus*, começa por provocar inibição em todas as quantidades aplicadas, sendo que 10 µL e 25 µL chegam mesmo a 100 %. Mas este facto não se verifica no final do ensaio, em que todas as réplicas das quantidades 2 µL, 5 µL e 10 µL chegam ao mesmo diâmetro que o controlo. A análise estatística revela que o controlo é significativamente diferente em relação a todas as quantidades de OE aplicado, tal como os 2 µL são diferentes de todas as quantidades. As três restantes são idênticas entre si.

*M. alternifolia* provoca em *P. chlamydospora* um comportamento semelhante a *C. nardus*, mas com a diferença que a quantidade 2  $\mu\text{L}$  tem menos poder inibidor do crescimento micelar, de apenas 10 %. À exceção da quantidade 25  $\mu\text{L}$ , todas as outras não têm um efeito inibidor no final do ensaio, desenvolvendo-se tanto como o controlo. Estatisticamente, o controlo é idêntico a 2  $\mu\text{L}$ , mas diferente das restantes quantidades. Destaca-se 5 $\mu\text{L}$  como sendo significativamente diferente de todas as quantidades e 10  $\mu\text{L}$  e 25  $\mu\text{L}$  são também idênticos.

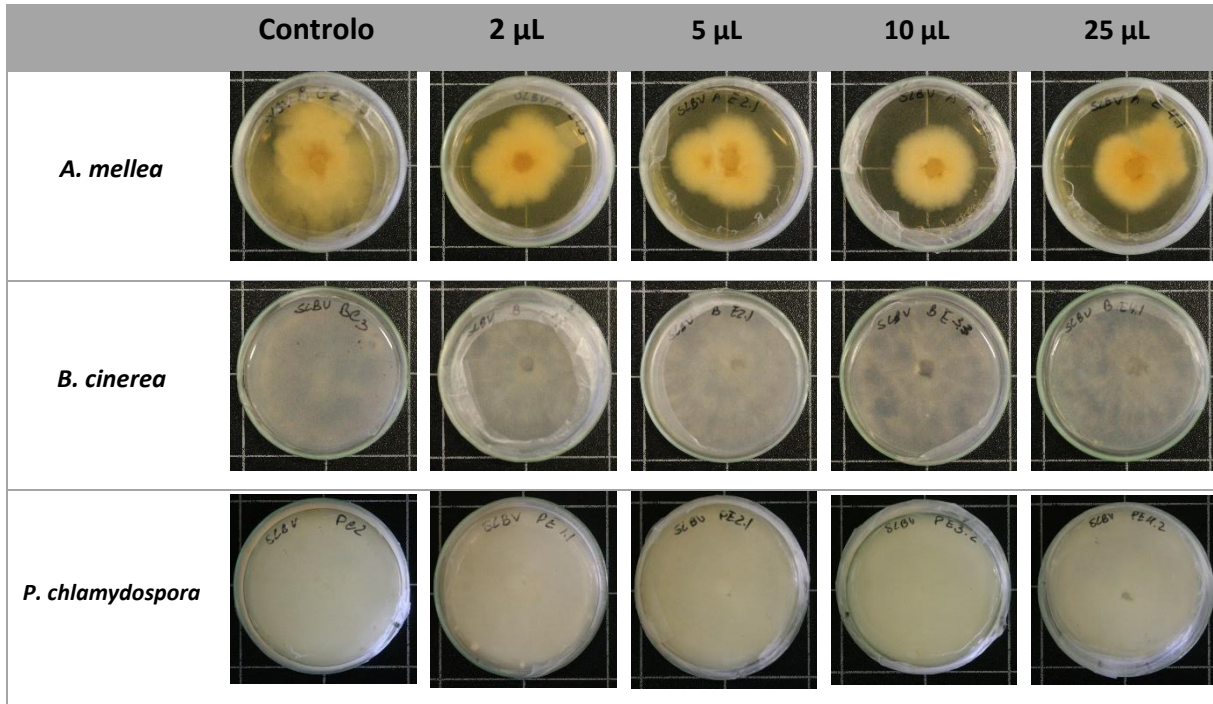
O OE de *T. mastichina* destaca-se como sendo o que tem menor efeito inibidor do crescimento em diâmetro de *P. chlamydospora*, de entre os cinco OE testados. Ao 4<sup>o</sup> dia de ensaio apenas a quantidade 25  $\mu\text{L}$  provoca uma inibição de 100 %, mas acaba por perder dito efeito no final da experiência, sendo que todas as réplicas de todas as quantidades crescem tanto como o controlo.

Por fim, o OE de *P. ruderale* provoca uma inibição de 100 % a partir de aplicados 5  $\mu\text{L}$ . No quarto dia de ensaio as réplicas com 2  $\mu\text{L}$  de OE ainda apresentam em média 3 % de inibição. Portanto, estatisticamente o controlo e 2  $\mu\text{L}$  são idênticos e estatisticamente diferentes das quantidades 5  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{L}$  e 25  $\mu\text{L}$ , já estas são também idênticas entre si.

Depois de uma análise às imagens e gráficos, pode-se afirmar que os melhores OE inibidores de crescimento de *P. chlamydospora* são o OE de *C. nardus* e o OE de *C. zeylanicum*, já que para ambos apenas se observa o crescimento da colónia quando em contacto com a menor quantidade (2  $\mu\text{L}$ ) de OE aplicado na placa de petri. O OE de *M. alternifolia* apenas tem um efeito inibitório do crescimento do fungo quando em maiores quantidades e o OE de *P. ruderale* apenas abranda o crescimento de *P. chlamydospora* numa fase inicial.

### 3.3. Inibição do crescimento micelar por ação do Mekzol

Tabela 7 - Comparação do efeito de Mekzol em diferentes quantidades (2  $\mu$ L, 5  $\mu$ L, 10  $\mu$ L e 25  $\mu$ L) no crescimento micelar em *A. mellea*, *B. cinerea* e *P. chlamydospora* no final do ensaio.



O Mekzol foi testado para o perceber o seu efeito no desenvolvimento micelar de *A. mellea*, *B. cinerea* e *P. chlamydospora*.

Em baixo encontram-se os gráficos que mostram o efeito ao longo dos dias de ensaio para cada espécie (Figuras 35-37).

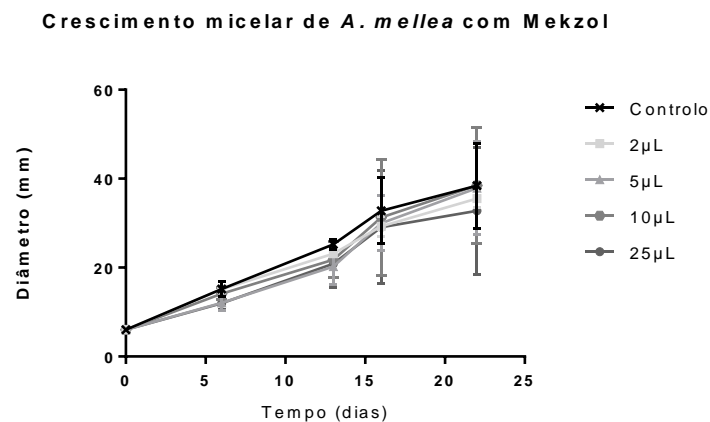


Figura 29 - Crescimento micelar (mm) de *A. mellea* em contato com OE de Mekzol nas quantidades 2  $\mu$ L, 5  $\mu$ L, 10  $\mu$ L e 25  $\mu$ L ao longo do ensaio.

Crescimento micelar de *B. cinerea* com Mekzol

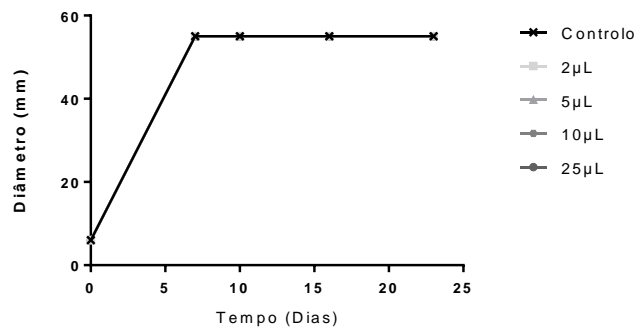


Figura 30 - Crescimento micelar (mm) de *B. cinerea* em contato com OE de Mekzol nas quantidades 2 µL, 5 µL, 10 µL e 25 µL ao longo do ensaio.

Crescimento micelar de *P. chlamydospora* com Mekzol

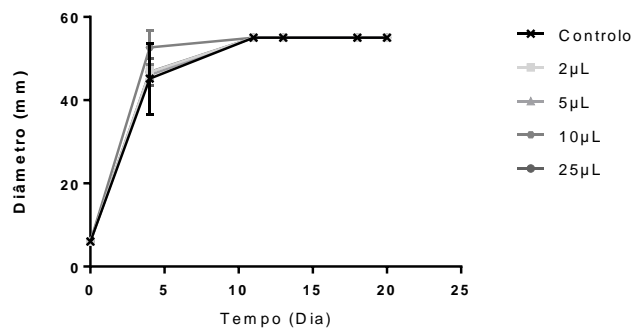


Figura 31 - Crescimento micelar (mm) de *P. chlamydospora* em contato com OE de Mekzol nas quantidades 2 µL, 5 µL, 10 µL e 25 µL ao longo do ensaio.

Como se pode observar, não há nenhuma diferença significativa no crescimento micelar de nenhuma das espécies, quando em contacto com qualquer uma das quantidades de Mekzol. Em *P. chlamydospora* observa-se ainda que numa fase inicial pode mesmo ter potenciado o desenvolvimento do fungo, crescendo mais em relação ao controlo.

Na Figura 38 encontram-se as percentagens de inibição ao 16º dia de ensaio no caso de *A. mellea* e ao 7º dia para *B. cinerea* e ao 4º dia de *P. chlamydospora*. Foram seleccionados estes dias por corresponderem à altura em que também o controlo de



encontrava em fase de crescimento, e são diferentes para os três fungos pois estes têm velocidades de crescimento diferentes.

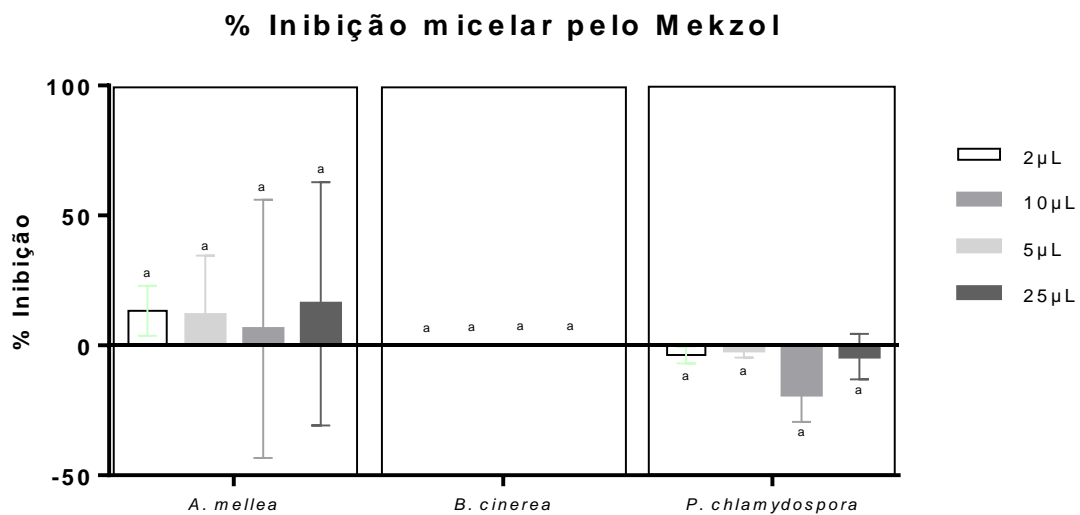


Figura 32 - Percentagem de inibição do crescimento de *A. mellea*, *B. cinerea* e *P. chlamydospora* em contato com Mekzol em diferentes quantidades (2 µL, 5 µL, 10 µL e 25 µL).

No caso de *A. mellea* pode-se observar que já uma grande diferença entre as réplicas de cada quantidade aplicada, sendo que a % de inibição mais alta verifica-se quando aplicados 25 µL de Mekzol (16 %).

*B. cinerea* não apresenta variações em relação ao controle, com 0 % de inibição do crescimento micelar por parte de Mekzol, para qualquer uma das quantidades aplicadas.

Já *P. chlamydospora*, no 4<sup>o</sup> dia de ensaio, sofre estimulação do crescimento em relação ao controle, quando aplicada qualquer quantidade de Mekzol, o que explica valores negativos.

### 3.4. Inibição da germinação de esporos de *B. cinerea*

Os gráficos seguintes mostram a evolução da percentagem de esporos germinados às 12 h, 24 h e 48 h após inoculação dos esporos em contacto com OE de *C. zeylanicum* (Figura 33), OE de *P. ruderale* (Figura 34), eugenol (Figura 35) e eugenol encapsulado (Figura 36).

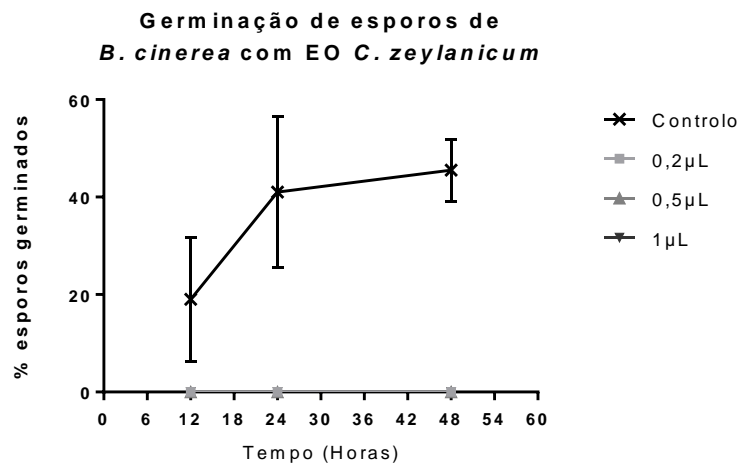


Figura 33 - Percentagem de germinação de esporos de *B. cinerea* em contacto com OE de *C. zeylanicum* nas quantidades 0,2 µL, 0,5 µL e 1 µL ao longo do ensaio.

Esporos de *B. cinerea* não germinaram, ao longo do ensaio, em contacto com nenhuma das quantidades de OE. Este OE provoca, portanto, uma total inibição da germinação de esporos, mesmo na menor quantidade.

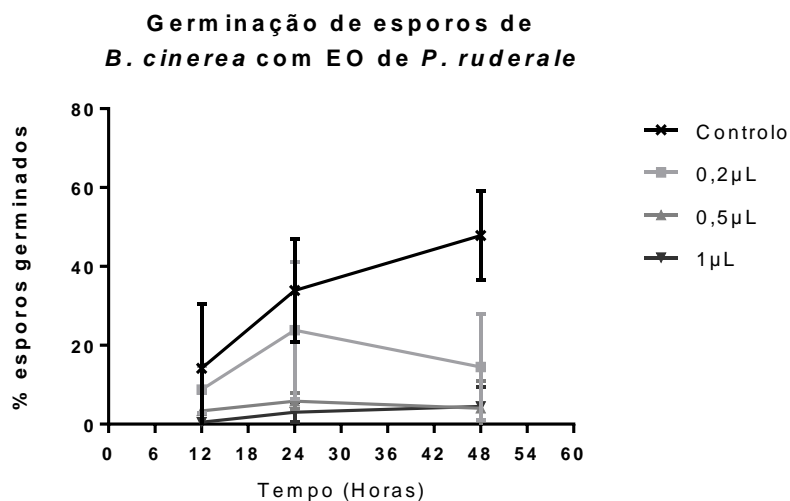


Figura 34 - Percentagem de germinação de esporos de *B. cinerea* em contacto com OE de *P. ruderale* nas quantidades 0,2 µL, 0,5 µL e 1 µL ao longo do ensaio.

Com o OE de *P. ruderale* já se observou a germinação de alguns esporos de *B. cinerea*, logo desde as 12 h da experiência. Às 24 h de ensaio, com 0,2  $\mu$ L de OE, havia uma média de aproximadamente 24 % de % de germinação, com 5  $\mu$ L verificou-se que este valor caía para os 6 % e com 1  $\mu$ L era de apenas 3 %.

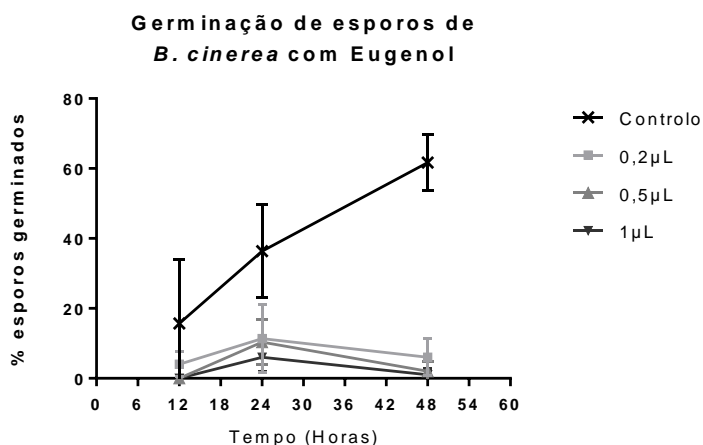


Figura 35 - Percentagem de germinação de esporos de *B. cinerea* em contato com eugenol nas quantidades 0,2  $\mu$ L, 0,5  $\mu$ L e 1  $\mu$ L ao longo do ensaio.

Na primeira observação, às 12 h, apenas foram observados esporos de *B. cinerea* germinados quando em contato com 0,2  $\mu$ L de eugenol, com cerca de 4 % de esporos germinados. Às 24 h a percentagem de esporos germinados cresce ligeiramente, mas às 48 h verifica-se que o nº de esporos germinados volta a descer. Este fenómeno pode ocorrer devido à elevada volatilidade do eugenol, que pode ser escapado do tubo, mesmo este estando fechado com parafilme.

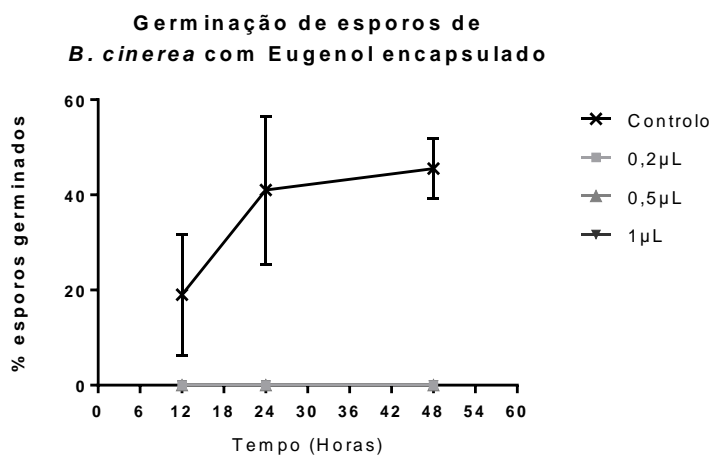


Figura 36 - Percentagem de germinação de esporos de *B. cinerea* em contato com eugenol encapsulado nas quantidades 0,2  $\mu$ L, 0,5  $\mu$ L e 1  $\mu$ L ao longo do ensaio.

No caso do eugenol encapsulado em micropartículas observa-se um resultado diferente ao do eugenol livre. Não foi observado qualquer esporo germinado, em nenhuma das réplicas, ao longo de todo o ensaio.

A percentagem de inibição da germinação dos esporos ao fim de 24 h apresenta-se na Figura 37.

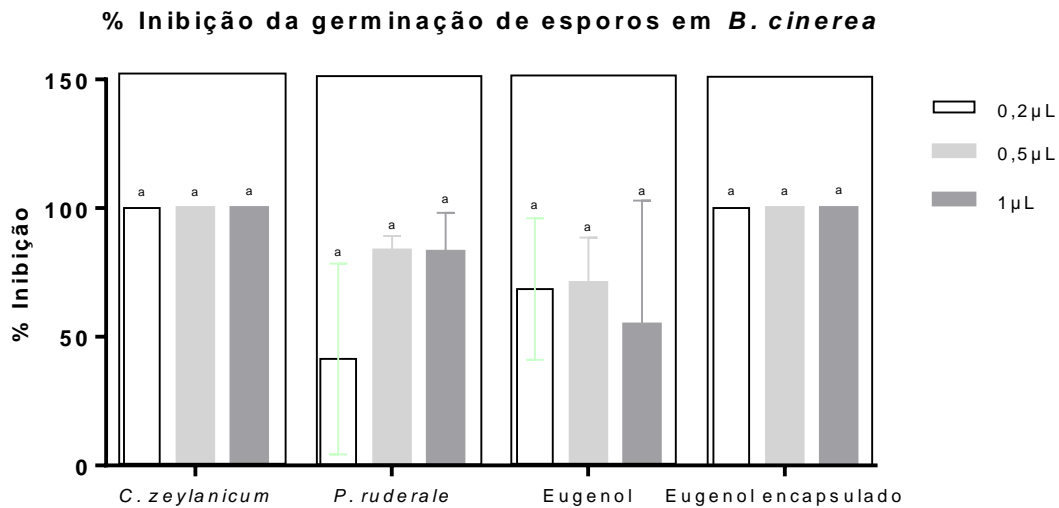


Figura 37 - Percentagem de inibição da germinação de esporos de *B. cinerea* em contato com OE de *C. zeylanicum*, OE de *P. ruderale*, eugenol e eugenol encapsulado em diferentes quantidades (0,2 µL, 0,5 µL e 1 µL) ao fim de 24 h.

Com OE de *C. zeylanicum*, ao fim de 24 h não se observou germinação de esporos de *B. cinerea*. Isto significa que para qualquer uma das quantidades aplicadas, há uma inibição de 100 % da germinação de esporos de *B. cinerea*. Estatisticamente, todas as quantidades aplicadas são idênticas entre si. Dos dois OE estudados este foi o que apresentou melhores resultados na inibição da germinação de esporos.

Já o OE de *P. ruderale*, quando aplicados 0,2 µL, provoca uma inibição da germinação na ordem dos 41 % e no caso de 0,5 µL e 1 µL há uma inibição de 83 % da germinação dos esporos. Não existem diferenças estatísticas diferentes entre as quantidades de OE aplicadas.

No caso do eugenol livre observou-se que com 0,5 µL há uma inibição de aproximadamente 71 %, sendo esta a quantidade que mais inibiu a germinação dos esporos. A análise estatística revela que as diferentes quantidades de eugenol aplicadas são idênticas entre si.

Ao contrário do que aconteceu com eugenol livre, quando este se encontra encapsulado apresenta uma inibição de 100 % da germinação dos esporos de *B. cinerea*. Tal como acontece com os OEs, a análise estatística mostra que não há diferenças significativas entre as quantidades da suspensão de eugenol encapsulado.

Pode-se explicar a maior capacidade de inibição da germinação por parte do eugenol encapsulado em micropartículas quando comparado com o eugenol livre pelo facto de acontecer uma libertação do composto mais lenta e constante ao longo do tempo.

Para testar se havia alguma interferência do “Zemea”, que foi usado para a suspensão dos encapsulados de eugenol, incubou-se também esporos na presença deste. Como se pode observar pelo gráfico seguinte (Figura 38), há grandes semelhanças no comportamento de *B. cinerea*, embora haja uma pequena diminuição da quantidade de esporos germinados, pelo que o “Zemea” não aparenta ter qualquer efeito nocivo ao crescimento do fungo.

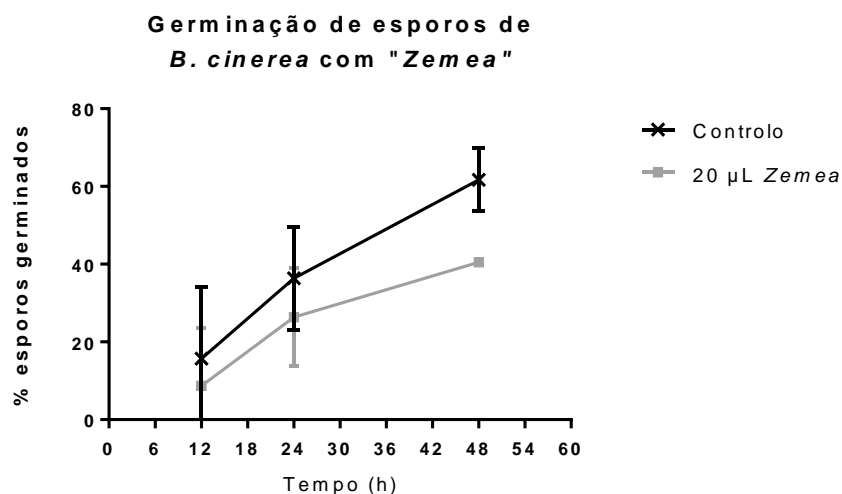


Figura 38 - Percentagem de germinação de esporos de *B. cinerea* em contato com 20 µL “Zemea” ao longo do ensaio.

Embora tenha sido observada a germinação de esporos, a uma percentagem crescente ao longo do tempo, há uma ligeira diminuição da mesma. Pode acontecer que o “Zemea” interfira de alguma forma na germinação dos esporos, podendo ter influenciado os resultados da inibição da germinação de esporos de *B. cinerea* pelo eugenol encapsulado em micropartículas.

## **4. Conclusões finais**

---

Este projeto experimental tinha como objetivo a busca de uma forma de controlo mais sustentável para algumas doenças da videira, testando o efeito de diferentes OE sob fungos patogénicos.

Em relação ao efeito inibitório do crescimento micelar dos fungos verificou-se que cada fungo foi afetado por cada OE numa escala diferente. Este facto pode ser explicado pelas diferentes composições de cada OE e o efeito que têm em cada espécie de fungo. O crescimento em diâmetro de *A. mellea* foi mais fortemente inibido pelos OE de *C. zeylanicum* (> 10 µL), que tem o melhor efeito, e ainda os OE de *C. nardus* (25 µL) e *T. mastichina* (25 µL). Tanto o OE de *C. zeylanicum* como o de *C. nardus* têm na sua composição o eugenol, conhecido pelas suas propriedades antifúngicas; já os OEs de *C. zeylanicum* e *C. nardus* partilham de elemol e canfeno como componentes. Em *B. cinerea*, os OEs com melhor efeito inibidor do crescimento foram o OE de *C. zeylanicum* e o OE de *M. alternifolia*, sendo que ambos os OEs têm p-cimeno na sua composição, ainda que numa quantidade pequena. A terceira espécie testada, *P. chlamydospora*, também teve o seu desenvolvimento mais afetado pelo OE de *C. zeylanicum*, mas também por *C. nardus* (25 µL) e *M. alternifolia* (25 µL). Com base em toda a informação recolhida, pode-se concluir que o OE testado com melhores efeitos inibitórios do crescimento micelar de qualquer uma das espécies fúngicas avaliadas foi o OE de *C. zeylanicum*. Mais uma vez foi provado o efeito antifúngico deste OE, que é maioritariamente devido à ação do eugenol. As semelhanças na composição entre os OEs que melhor efeito de inibição do crescimento do fungo têm também são a explicação do efeito antifúngico.

Quando testada a inibição da germinação de esporos de uma das espécies, *B. cinerea*, o objetivo centrou-se em encontrar um OE que fosse capaz de erradicar uma das formas de reprodução do fungo e o seu estado mais resistente. Conclui-se que mais uma vez o OE de *C. zeylanicum*, de entre os dois OEs testados, foi o que se destacou com 100 % de inibição da germinação de esporos. O eugenol foi testado neste caso para avaliar qual o seu efeito quando usado isolado. Foi usado na forma livre e encapsulado em micropartículas, sendo que foi encapsulado que apresentou resultados muito animadores, com 100 % de inibição da germinação fúngica. Este novo método permite o uso mais controlado de compostos presentes nos OE, aumentando a sua estabilidade à oxidação, reações à luz, humidade e altas temperaturas, protegendo as suas capacidades, melhorando a sua biodisponibilidade, já que aumenta o rácio volume/superfície [75].

O produto químico testado, que de alguma forma foi como que um controlo, o Mekzol, teve um efeito totalmente contrário ao dos OEs e do eugenol. Em *P. chlamydospora*, inclusivamente, potenciou o crescimento micelar do fungo numa fase inicial. Uma vez que este produto se encontra sob forma de solução e foi aplicado da mesma forma que os OEs, pode ter acontecido que não se conseguiu volatilizar e terá de ser exposto em contato direto com o fungo. A falta de inibição pode também ser explicada pelo facto de este produto ser destinado ao uso em sobreiros e seja específico para atuar sobre os fungos que afetam a referida espécie.

Os objetivos iniciais foram assim cumpridos. No futuro poderão ser feitos mais testes, nomeadamente para testar soluções com diferentes OE, capazes de potenciar ainda mais os seus efeitos antifúngicos aliando os seus diferentes componentes. Também será importante avaliar o efeito *in situ* em videiras. É necessário ajustar as quantidades de OE a aplicar de forma a não se apresentarem tóxicos e não interferirem com os processos fisiológicos da planta.





## **Referências bibliográficas**

---

## Bibliografia

- [1] P. This, T. Lacombe e M. R. Thomas, "Historical origins and genetic diversity of wine grapes", *TRENDS in Genetics Vol.22 No.9*, pp. 511-519, 2006.
- [2] M. K. Aradhya, G. S. Dangl, B. H. Prins, J.-M. Boursiquot, M. A. Walker, C. Meredith e C. J. Simon, "Genetic structure and differentiation in cultivated grape, *Vitis vinifera* L.," *Genet. Res., Camb.*, pp. 179-192, 2003.
- [3] J. Cunha, M. Teixeira Santos, L. C. Carneiro, P. Fevereiro e J. E. Eiras-Dias, "Portuguese traditional grapevine cultivars and wild vines (*Vitis vinifera* L.) share morphological and genetic traits," *Genetic Resources and Crop Evolution*, vol. 56, pp. 975-989, 2009.
- [4] L.-T. Dinis, A. C. Malheiro, A. Luzio, H. Fraga, H. Ferreira, I. Gonçalves, G. Pinto, C. M. Correia e J. Moutinho-Pereira, "Improvement of grapevine physiology and yield under summer stress by kaolin-foliar application: water relations, photosynthesis and oxidative damage," *Photosynthetica*, vol. 56, pp. 641-651, 2018.
- [5] I. N. d. Estatística, "Estatísticas Agrícolas 2014," Instituto Nacional de Estatística, I.P., Portugal, 2015.
- [6] H. Fraga, J. A. Santos, A. C. Malheiro, A. A. Oliveira, J. Moutinho-Pereira e G. V. Jones, "Climatic suitability of Portuguese grapevine varieties and climate change adaptation," *International Journal of Climatology*, vol. 36, pp. 1-12, 2016.
- [7] F. J. Marques, V. Pedroso, H. Trindade e J. L. Pereira, "Impact of vineyard cover cropping on carbon dioxide and nitrous oxide emissions in Portugal," *Atmospheric Pollution Research*, vol. 9, pp. 105-111, 2018.
- [8] "Wines of Portugal," [Online]. Available: <http://www.winesofportugal.info/pagina.php?codNode=18012>. [Acedido em 02 08 2018].
- [9] "Catalogue of Life," [Online]. Available: <http://www.catalogueoflife.org/col/details/species/id/321c79621877a1f6519b2e0ddb69845b>. [Acedido em 19 05 2018].
- [10] M. Akaberi e H. Hosseinzadeh, "Grapes (*Vitis vinifera*) as a Potential Candidate for the Therapy of the Metabolic Syndrome," *Phytotherapy Research*, vol. 30, pp. 540-556, 2016.
- [11] A. Teixeira, J. Eiras-Dias, S. D. Castellarin e H. Gerós, "Berry Phenolics of Grapevine under Challenging Environments," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 14, pp. 18711-18739, 2013.

- [12] J. Garrido e F. Borges, "Wine and grape polyphenols — A chemical perspective," *Food Research International*, vol. 54, pp. 1844-1858, 2013.
- [13] M. F. Basso, T. V. M. Fajardo e F. Saldarelli, "Grapevine virus diseases: Economic impact and current advances in viral prospection and management," vol. 39, 2016.
- [14] J. E. Stajich, M. L. Berbee, M. Blackwell, D. S. Hibbett, T. Y. James, J. W. Spatafora e J. W. Taylor, "The Fungi," *Current Biology*, vol. 19, pp. 840-845, 2010.
- [15] D. J. McLaughlin, D. S. Hibbett, F. Lutzoni, J. W. Spatafora e R. Vilgalys, "The search for the fungal tree of life," *Trends in Microbiology*, vol. 17, pp. 488-497, 2009.
- [16] O. Aguín, M. Abuín, F. Lozano, V. Ferreiroa, M. Corral e J. P. Mansilla, "Incidencia y distribución del género *Armillaria* en viñedos de las cinco denominaciones de origen de vino de Galicia (noroeste de España)," *Revista Iberoamericana de Micología*, 2014.
- [17] "Mycobank," [Online]. Available: [http://www.mycobank.org/Biolomics.aspx?Table=Mycobank&MycoBankNr\\_=190066](http://www.mycobank.org/Biolomics.aspx?Table=Mycobank&MycoBankNr_=190066). [Acedido em 15 03 2018].
- [18] R. C. Ullrich e J. B. Anderson , "Sex and Diploidy in *Armillaria mellea*," *Experimental Micology* , vol. 2, pp. 119-129, 1978.
- [19] O. Aguín, J. P. Mansilla e M. J. Sainz, "In vitro selection of an effective fungicide against *Armillaria mellea* and control of white root rot of grapevine in the field," *Pest Management Science*, vol. 62, pp. 223-228, 2006.
- [20] I. Pertot, D. Gobbin, F. De Luca e D. Prodorutti, "Methods of assessing the incidence of *Armillaria* root rot across viticultural areas and the pathogen's genetic diversity and spatial-temporal pattern in northern Italy," *Crop Protection* , vol. 27, pp. 1061-1070, 2008.
- [21] T. Thomidis e E. Exadaktylou, "Effectiveness of cyproconazole to control *Armillaria* root rot of apple, walnut and kiwifruit," *Crop Protection*, vol. 36, pp. 49-51, 2012.
- [22] R. T. V. Fox, "Managing *Armillaria* root rot," *Food, Agriculture & Environment* , vol. 1(1), pp. 95-100, 2003.
- [23] A. Nogales, J. Aguirreolea, E. Santa María, A. Camprubí e C. Calvet, "Response of mycorrhizal grapevine to *Armillaria mellea* inoculation: disease development and polyamines," *Plant Soil*, pp. 177-187, 2009.
- [24] G. Goetz, A. Fkyerat, N. Métais, M. Kunz, R. Tabacchi, R. Pezet e V. Pont, "Resistance factors to grey mould in grape berries: identification of some phenolics inhibitors of *Botrytis cinerea* stilbene oxidase," *Phytochemistry*, vol. 52, pp. 759-767, 1999.

- [25] L. Mendoza, K. Yañez, M. Vivanco, R. Melo e M. Cotoras, "Characterization of extracts from winery by-products with antifungal activity against *Botrytis cinerea*," *Industrial Crops and Products*, vol. 43, pp. 360-364, 2013.
- [26] J. M. Cantoral e I. G. Collado, "Filamentous Fungi (*Botrytis cinerea*)," em *Molecular Wine Microbiology*, 2011, pp. 257-277.
- [27] "Mycobank," [Online]. Available: <http://www.mycobank.org/BioloMICSDetails.aspx?Rec=3370>. [Acedido em 24 07 2018].
- [28] P. Campia, G. Venturini, P. Moreno-Sanz, P. Casati e S. Toffolatti, "Genetic structure and fungicide sensitivity of *Botrytis cinerea* populations isolated from grapevine in northern Italy," *Plant Pathology*, vol. 66, pp. 890-899, 2017.
- [29] A. Santos, A. Sánchez e D. Marquina, "Yeasts as biological agents to control *Botrytis*," *Microbiological Research*, vol. 159, pp. 331-338, 2004.
- [30] K. Dadakova, M. Havelkova, B. Kurkova, I. Tlofkova, T. Kasparovsky, Z. Zdrahal e J. Lochman, "Proteome and transcript analysis of *Vitis vinifera* cell cultures subjected to *Botrytis cinerea* infection," *Journal of Proteomics*, vol. 119, pp. 143-153, 2015.
- [31] R. P. Naegele, "Evaluation of Host Resistance to *Botrytis* Bunch Rot in *Vitis* spp. and Its Correlation with *Botrytis* Leaf Spot," *Hort Science*, vol. 53, pp. 204-207, 2018.
- [32] "Population structure and temporal maintenance of the multihost fungal pathogen *Botrytis cinerea*: causes and implications for disease management," *Environmental Microbiology*, vol. 17, pp. 1261-1274, 2015.
- [33] M. Adrian e P. Jeandet, "Effects of resveratrol on the ultrastructure of *Botrytis cinerea* conidia and biological significance in plant/pathogen interactions," *Fitoterapia*, vol. 83, pp. 1345-1350, 2012.
- [34] M. A. Jacometti, S. Wratten e M. Walter, "Review: Alternatives to synthetic fungicides for *Botrytis cinerea* management in vineyards," *Australian Journal of Grape and Wine Research*, vol. 16, pp. 154-172, 2010.
- [35] D. Xu, Y. Deng, T. Han, L. Jiang, P. Xi, Q. Wang e Z. Jiang, "In vitro and in vivo effectiveness of phenolic compounds for the control of postharvest gray mold of table grapes," *Postharvest Biology and Technology*, vol. 139, pp. 106-114, 2018.
- [36] H. Valdés-Gómez, M. Fermaud, J. Roudet, A. Calonnec e C. Gary, "Grey mould incidence is reduced on grapevines with lower vegetative and reproductive growth," *Crop Protection*, vol. 27, pp. 1174-1186, 2008.

- [37] S. M. Sanzania, L. Schena, V. D. Cicco e A. Ippolito, "Early detection of *Botrytis cinerea* latent infections as a tool to improve postharvest quality of table grapes," *Postharvest Biology and Technology*, vol. 68, pp. 64-71, 2012.
- [38] N. Ciliberti, M. Fermaud, L. Languasco e V. Rossi, "Influence of Fungal Strain, Temperature, and Wetness Duration on Infection of Grapevine Inflorescences and Young Berry Clusters by *Botrytis cinerea*," *Phytopathology*, vol. 105, pp. 325-333, 2015.
- [39] I. Pertot, O. Giovannini, M. Benanchi, T. Caffi, V. Rossi e L. Mugnai, "Combining biocontrol agents with different mechanisms of action in a strategy to control *Botrytis cinerea* on grapevine," *Crop Protection*, vol. 97, pp. 85-93, 2017.
- [40] O. A. Karabulut, F. M. Gabler, M. Mansour e J. L. Smilanick, "Postharvest ethanol and hot water treatments of table grapes to control gray mold," *Postharvest Biology and Technology*, vol. 34, pp. 169-177, 2004.
- [41] G. Romanazzi, O. A. Karabulut e J. L. Smilanick, "Combination of chitosan and ethanol to control postharvest gray mold of table grapes," *Postharvest Biology and Technology*, vol. 45, pp. 134-140, 2007.
- [42] D. Molitor, M. Schultz, B. Friedrich, O. Viret, L. Hoffmann e M. Beyer, "Efficacy of fenhexamid treatments against *Botrytis cinerea* in grapevine as affected by time of application and meteorological conditions," *Crop Protection*, vol. 110, pp. 1-13, 2018.
- [43] M. Fischer e H.-H. Kassemeyer, "Fungi associated with Esca disease of grapevine in Germany," *Vitis*, vol. 3, pp. 109-116, 2003.
- [44] A. Andolfi, L. Mugnai, J. Luque, G. Surico, A. Cimmino e A. Evidente, "Phytotoxins Produced by Fungi Associated with Grapevine Trunk Diseases," *Toxins*, vol. 3, pp. 1569-1605, 2011.
- [45] "Mycobank," [Online]. Available: <http://www.mycobank.org/BioloMICSDetails.aspx?Rec=58409>. [Acedido em 24 07 2018].
- [46] J. Sofia, J. Trovão, A. Portugal, H. Paiva de Carvalho, N. Mesquita, T. Nascimento, C. Rego e M. T. Gonçalves, "Caracterização fenotípica e molecular de isolados de *Phaeomoniella chlamydospora* obtidos na região demarcada do Dão," 2016.
- [47] G. Surico, L. Mugnai e G. Marchi, "The Esca Disease Complex," em *Integrated Management of Diseases Caused by Fungi, Phytoplasma and Bacteria*, 2008, pp. 119-136.
- [48] G. A. Díaz e B. A. Latorre, "Infection Caused by *Phaeomoniella chlamydospora* Associated with Esca-like Symptoms in Grapevine in Chile," *Plant Disease*, vol. 98, pp. 351-360, 2014.

- [49] J. M. Van Neeckerk, F. Halleen e P. H. Fourie, "Temporal susceptibility of grapevine pruning wounds to trunk pathogen infection in South African grapevines," *Phytopathologia Mediterranea*, vol. 50, pp. 139-150, 2011.
- [50] A. Spagnolo, M. Magnin-Robert, T. Dilezitoko Alayi, C. Cilindre, L. Mercier, C. Schaeffer-Reiss, A. Van Dorsselaer, C. Clément e F. Fontaine, "Physiological Changes in Green Stems of *Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay in Response to Esca Proper and Apoplexy Revealed by Proteomic and Transcriptomic Analyses," *Journal of Proteome Research*, vol. 11, pp. 461-475, 2012.
- [51] L. Mugnai, A. Graniti e G. Surico, "Esca (Black Measles) and Brown Wood-Streaking: Two Old and Elusive Diseases of Grapevines," *Plant Disease*, vol. 83, pp. 404-418, 1999.
- [52] R. Haidar, J. Roudet, O. Bonnard, M. C. Dufour, M. F. Corio-Costet, M. Fert, T. Gautier, A. Deschamps e M. Fermaud, "Screening and modes of action of antagonistic bacteria to control the the fungal pathogen *Phaeoemoniella chlamydospora* involved in grapevinetrunk diseases," *Microbiological Research*, vol. 192, pp. 172-184, 2016.
- [53] R. . J. Pierron, M. Pages, C. Couderca, S. Compantd, A. Jacquesa e F. Violleau, "In vitro and in planta fungicide properties of ozonated water againstthe esca-associated fungus *Phaeoacremonium aleophilum*," *Scientia Horticulturae*, vol. 189, pp. 184-191, 2015.
- [54] C. Santos, S. Fragoeiro, H. Oliveira e A. Phillips, "Response of *Vitis vinifera* L. plants inoculated with *Phaeoacremonium angustius* and *Phaeoemoniella chlamydospora* to thiabendazole, resveratrol and sodium arsenite," *Scientia Horticulturae*, vol. 107, pp. 131-136, 2006.
- [55] A. Alfonso, G. Conigliaro, L. Torta, S. Burruano e G. Moschetti, "Antagonismof *Bacillus subtilis* strain AG1 against vine wood fungal pathogens.," *Phytopathologia Mediterranea*, vol. 48, pp. 155-158, 2009.
- [56] F. Mailly, L. Hossard, J.-M. Barbier, M. Thiollet-Scholtus e C. Gary, "Quantifying the impact of crop protection practices on pesticide use in wine-growing systems," *European Journal of Agronomy*, pp. 23-24, 2017.
- [57] A. Maia, J. Oliveira, K. Schwan-Estrada, C. Faria , A. Batista, W. Costa e B. Batista, "The control of isariopsis leaf spot and downy mildew in grapevine cv. Isabel with the essential oil of lemon grass and the activity of defensive enzymes in response to the essential oil," *Crop Protection*, vol. 63, pp. 57-67, 2014.
- [58] S. M. F. d. M. Abreu, "Estudos dos fungicidas Qol na vinha e nos vinhos Portugueses," Porto, 2007.
- [59] M. Komárek, E. Čadková, V. Chrastný, F. Bordas e J.-C. Bollinger, "Contamination of vineyard soils with fungicides: A review of environmental and toxicological aspects," *Environment International*, pp. 138-151, 2010.

- [60] C. Patinha, N. Durães, A. C. Dias, P. Pato, R. Fonseca, A. Janiero, F. Barriga, A. P. Reis, A. Duarte, E. Ferreira da Silva, A. J. Sousa e A. Cachada, "Long-term application of the organic and inorganic pesticides in vineyards: Environmental record of past use," *Applied Geochemistry*, pp. 226-238, 2018.
- [61] J.-L. Ríos, "Essential Oils: What They Are and How the Terms Are Used and Defined," em *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*, EUA, 2016, pp. 4-10.
- [62] R. Ribeiro-Santos, M. Andrade, N. Ramos de Melo, F. R. d. Santos, I. d. A. Neves e M. G. d. Carvalho, "Biological activities and major components determination in essential oils intended for a biodegradable food packaging," *Industrial Crops and Products*, vol. 97, pp. 201-210, 2017.
- [63] A. C. Stratakos e A. Koidis, "Methods for Extracting Essential Oils," em *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*, EUA, 2016, pp. 31-38 .
- [64] A. Servili, E. Feliziani e G. Romanazzi, "Exposure to volatiles of essential oils alone or under hypobaric treatment to control postharvest gray mold of table grapes," *Postharvest Biology and Technology*, vol. 133, pp. 36-40, 2017.
- [65] S. Sugumar, V. Ghosh, A. Mukherjee e N. Chandrasekaran, "Essential Oil-Based Nanoemulsion Formation by Low- and High-Energy Methods and Their Application in Food Preservation against Food Spoilage Microorganisms," em *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*, EUA, 2016, pp. 93-100.
- [66] J. V. Gómez, A. Tarazona, R. Mateo-Castro, J. V. Gimeno-Adelantado, M. Jiménez e E. M. Mateo, "Selected plant essential oils and their main active components, a promising approach to inhibit aflatoxigenic fungi and aflatoxin production in food," *Food Additives & Contaminants: Part A*, 2018.
- [67] B. Melgarejo-Flores, L. Ortega-Ramírez, B. Silva-Espinoza, G. González-Aguilar, M. Miranda e J. Ayala-Zavala, "Antifungal protection and antioxidant enhancement of table grape treated with emulsions, vapors, and coatings of cinnamon leaf oil," *Postharvest Biology and Technology*, vol. 86, pp. 321-328, 2013.
- [68] R. Ribeiro-Santos, A. Sanches-Silva, J. F. G. Mottad, M. Andrade, I. d. A. Neves, R. F. Teófilo, M. G. d. Carvalho e N. R. d. Melo, "Combined use of essential oils applied to protein base active food packaging: Study in vitro and in a food simulant," *European Polymer Journal*, vol. 93, pp. 75-86, 2017.
- [69] M. Nikkhah, M. Hashemi, M. B. H. Najafi e R. Farhoosh, "Synergistic effects of some essential oils against fungal spoilage on pear fruit," *International Journal of Food Microbiology*, vol. 257, pp. 285-294, 2017.



- [70] M. Unlu, E. Ergene, G. V. Unlu, H. S. Zeytinoglu e N. Vural, "Composition, antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity of essential oil from *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae)," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 48, pp. 3274-3280, 2010.
- [71] P. Ranasinghe, S. Pigera, G. S. Premakumara, P. Galappaththy, G. R. Constantine e . P. Katulanda, "Medicinal properties of 'true' cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*): a systematic review," *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2013.
- [72] G. A. Cardoso-Ugarte, A. López-Malo e M. E. Sosa-Morales, "Cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) Essential Oils," em *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*, EUA, 2016, pp. 339-347.
- [73] R. Ribeiro-Santos, M. Andrade, D. Madella, A. P. Martinazzo, L. d. A. Garcia Moura, N. Ramos de Melo e A. Sanches-Silva, "Revisiting an ancient spice with medicinal purposes: Cinnamon," *Trends in Food Science & Technology*, vol. 62, pp. 154-169, 2017.
- [74] S. Masghati e S. M. Ghoreishi, "Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of cinnamaldehyde and eugenol from cinnamon bark: Optimization of operating conditions via response surface methodology," *The Journal of Supercritical Fluids*, vol. 140, pp. 62-71, 2018.
- [75] S. Bhattacharya, "Cultivation of Essential Oils," em *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*, EUA, 2016, pp. 19-29.
- [76] M. A. Abdulazeez, A. S. Abdullahi e B. D. James, "Lemongrass (*Cymbopogon* spp.) Oils," em *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*, EUA, 2016, pp. 509-516.
- [77] B. Solomon, F. Sahle, T. Gebre-Mariam, K. Asres e R. Neubert, "Microencapsulation of citronella oil for mosquito-repellent application: Formulation and in vitro permeation studies," *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 80, pp. 61-66, 2012.
- [78] L. S. Wei e W. Wee, "Chemical composition and antimicrobial activity of *Cymbopogon nardus* citronella essential oil against systemic bacteria of aquatic animals," *Iran Journal of Microbiology*, vol. 5, pp. 147-152, 2016.
- [79] L. G. D. Toledo, M. A. D. S. Ramos, L. Spósito, E. M. Castilho, F. R. Pavan, É. D. O. Lopes, G. J. Zocolo, F. A. N. Silva, T. H. Soares, A. G. d. Santos, T. M. Bauab e M. T. G. D. Almeida, "Essential Oil of *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle: A Strategy to Combat Fungal Infections Caused by *Candida* Species," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 17, 2016.
- [80] S. Kpoviessi, J. Bero, P. Agbani, F. Gbaguidi, B. Kpadonou-Kpoviessi, B. Sinsin, G. Accrombessi, M. Frédérick, M. Moudachirou e J. Quetin-Leclercq, "Chemical composition, cytotoxicity and in vitro antitrypanosomal and antiplasmodial activity of the essential oils of four *Cymbopogon* species from Benin," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 151, pp. 652-659, 2014.

- [81] J. Sharifi-Rad, B. Salehi, E. M. Varoni, F. Sharopov, Z. Yousof, S. A. Ayatollahi, F. Kobarfard, M. Sharifi-Rad, M. H. Afdjei, M. Sharifi-Rad e M. Iriti, "Plants of the Melaleuca Genus as Antimicrobial Agents: From Farm to Pharmacy," *Phytotherapy Research*, vol. 31, pp. 1475-1494, 2017.
- [82] L. d. O. Felipe, W. F. d. S. Júnior, K. Corrêa de Araújo e D. L. Fabrino, "Lactoferrin, chitosan and Melaleuca alternifolia—natural products that show promise in candidiasis treatment," *Brazilian Journal of Microbiology*, Vols. %1 de %2212-219, p. 49, 2018.
- [83] "UTAD - Jardim Botânico," [Online]. Available: [https://jb.utad.pt/especie/Thymus\\_mastichina](https://jb.utad.pt/especie/Thymus_mastichina). [Acedido em 10 05 2018].
- [84] T. Delgado, P. Marinero, M. C. Asensio-S.-Manzanera, C. Asensio, B. Herrero, J. A. Pereira e E. Ramalhosa, "Antioxidant activity of twenty wild Spanish Thymus mastichina L. populations and its relation with their chemical composition," *LWT - Food Science and Technology*, vol. 57, pp. 412-418, 2014.
- [85] M. G. Miguel, C. Guerrero, H. Rodrigues, J. C. Brito, F. Duarte, F. Venâncio e R. Tavares, "Main Components of the Essential Oils from Wild Portuguese Thymus mastichina (L.) L. ssp. mastichina in Different Developmental Stages or Under Culture Conditions," *Journal of Essential Oil Research*, vol. 16, pp. 111-114, 2004.
- [86] U. R. Fontes-Jr, C. S. Ramos, M. R. Serafini, S. C. H. Cavalcanti, P. B. Alves, G. M. Lima, P. H. S. Andrade, L. R. Bonjardim, L. J. Quintans-Jr e A. A. Araújo, "Evaluation of the lethality of Porophyllum ruderale essential oil against Biomphalaria glabrata, Aedes aegypti and Artemia salina," *African Journal of Biotechnology*, vol. 11, pp. 3169-3172, 2012.
- [87] M. Z. B. Bezerra, M. Andrade-Neto e R. M. d. Freitas, "The Essential Oil of Porophyllum ruderale Cass (Asteraceae)," *Journal of*, vol. 14, pp. 14-15, 2002.
- [88] G. Guillet, A. Bellanger e J. Arnason, ". Volatile monoterpenes in Porophyllum gracile and P. ruderale "Asteraceae": identification, localization and insecticidal synergism with a-terthienyl," *Phytochemistry*, pp. 312-318, 1998.
- [89] M. Fonseca, R. Meira e V. Casali, "Vegetative Organ Anatomy and Histolocalization of Lipids and Phenolics Compounds in Porophyllum ruderale (Asteraceae)," *Planta Daninha*, pp. 707-713, 2006.
- [90] G. Miguel, M. Simões, A. C. Figueiredo, J. G. Barroso, L. G. Pedro e L. Carvalho, "Composition and antioxidant activities of the essential oils of Thymus caespitius, Thymus camphoratus and Thymus mastichina," *Food Chemistry*, pp. 183-188, 2004.
- [91] "Composition and Variability of the Essential Oils of Thymus Species from Section Mastichina from Portugal," *Biochemical Systematics and Ecology*, pp. 659-672, 1997.

- [92] M. Guynot, A. Ramos, L. Setó, P. Purroy, V. Sanchis e S. Marín, “Antifungal activity of volatile compounds generated by essential oils against fungi commonly causing deterioration of bakery products,” *Journal of Applied Microbiology*, pp. 893-899, 2003.
- [93] T. Thomidis e E. Exadaktylou, “Effectiveness of cyproconazole to control *Armillaria* root rot of apple, walnut and kiwifruit,” *Crop Protection* 36, pp. 49-51, 2012.
- [94] M. E. Guynot, A. J. Ramos, L. Setó, P. Purroy, V. Sanchis e S. Marín, “Antifungal activity of volatile compounds generated by essential oils against fungi commonly causing deterioration of bakery products,” *Journal of Applied Microbiology* 94, pp. 893-899, 2003.
- [95] S. Combrinck, T. Regnier e G. Kamatou, “In vitro activity of eighteen essential oils and some major components against common postharvest fungal pathogens of fruit,” *Industrial Crops and Products*, vol. 33, pp. 344-349, 2011.
- [96] M. C. Fonsceca, L. C. Barbosa, E. A. Nascimento e V. W. Casali, “Essential Oils from Leaves and Flowers of *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cassini (Asteraceae),” *Journal of Essential Oil Research*, vol. 18, 2006.
- [97] “IMAGE J - Image processing and analysis in Java,” [Online]. Available: <https://imagej.nih.gov/ij/>. [Acedido em 2018].
- [98] G. Singh, S. Maurya, M. deLampasona e C. A. Catalan, “comparison of chemical, antioxidant and antimicrobial studies of cinnamon leaf and bark volatile oils, oleoresins and their constituents,” *Food and Chemical Toxicology*, vol. 45, pp. 1650-1661, 2007.
- [99] S. Anzlovar, D. Baricevic, J. A. Avgustin e J. Dolenc Koce, “Essential Oil of Common Thyme as a Natural Antimicrobial Food Additive,” *Food Technology and Biotechnology*, vol. 52, p. 263–268, 2014.
- [100] Z. Zhang, G. Qin, B. Li e S. Tian, “Effect of Cinnamic Acid for Controlling Gray Mold on Table Grape and Its Possible Mechanisms of Action,” *Current Microbiology*, vol. 71, pp. 396-402, 2015.
- [101] C. L. Wilson, J. M. Solar, A. E. Ghaouth e M. E. Wisniewski, “Rapid Evaluation of Plant Extracts and Essential Oils for Antifungal Activity Against *Botrytis cinerea*,” *Plant Disease*, vol. 81, pp. 204-210, 1997.
- [102] A. Servili, E. Feliziani e G. Romanazzi, “Exposure to volatiles of essential oils alone or under hypobaric treatment to control postharvest gray mold of table grapes,” *Postharvest Biology and Technology*, vol. 133, pp. 36-40, 2017.
- [103] A. Vitoratos, D. Bilalis, A. Karkanis e A. Efthimiadou, “Antifungal Activity of Plant Essential Oils Against *Botrytis cinerea*, *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum*,” *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici*, vol. 41, pp. 86-92, 2013.

- [104] S. M. Nabavi, A. Marchese, M. Izadi, V. Curti, M. Daglia e S. F. Nabavi, "Plants belonging to the genus *Thymus* as antibacterial agents: From farm to pharmacy," *Food Chemistry*, vol. 173, pp. 339-347, 2015.
- [105] M. R. Duarte, M. C. N. Siebenrok e C. B. Empinotti, "Anatomia comparada de espécies de arnica: *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass. e *Chaptalia nutans* (L.) Pohl," *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, vol. 28, pp. 193-201, 2007.
- [106] H. G. d. Castro, V. B. d. M. Perini, . G. R. d. Santos e T. C. A. B. Leal, "Avaliação do teor e composição do óleo essencial de *Cymbopogon nardus* (L.) em diferentes épocas de colheita," *Revista Ciência Agronômica*, vol. 41, pp. 308-314, 2010.