

Screening de óleos essenciais contra *Lecanicillium fungicola*

Screening of essential oils against *Lecanicillium fungicola*

Detección de aceites esenciales contra *Lecanicillium fungicola*

Recebido: 29/07/2020 | Revisado: 05/08/2020 | Aceito: 9/08/2020 | Publicado: 17/08/2020

Lundoi Tobias Lee

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6055-3972>

Universidade Federal de Lavras, Brasil

E-mail: lundoilee@gmail.com

Lívia Martinez Abreu Soares Costa

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6768-1889>

Universidade Federal de Lavras, Brasil

E-mail: livinhamartinez@yahoo.com.br

Tatiana Silveira Junqueira de Moraes

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0359-4452>

Universidade Federal de Lavras, Brasil

E-mail: tatianajunqueira2@gmail.com

Cibelli Paula de Castro

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3028-0560>

Universidade Federal de Lavras, Brasil

E-mail: cibellizoomf@gmail.com

Lucas de Camargo Souza

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6646-8093>

Universidade Federal de Lavras, Brasil

E-mail: slucasdecamargo@gmail.com

Roberta Hilsdorf Piccoli

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2334-9400>

Universidade Federal de Lavras, Brasil

E-mail: rhpiccoli@ufla.br

Eustáquio Souza Dias

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3030-3825>

Universidade Federal de Lavras, Brasil

E-mail: esdiasmicro@gmail.com

Resumo

O fungo *Lecanicillium fungicola* é o agente causador da doença da bolha seca em cogumelos do tipo champignon (*Agaricus bisporus*), sendo responsável por perdas econômicas. Esse patógeno causa manchas e deformidades nos cogumelos, tornando-os inviáveis para comercialização. O seu controle pode ser feito com o uso de fungicidas, além das medidas sanitizantes. Entretanto, no Brasil não existe legislação vigente para a utilização de agrotóxicos em cultivos de cogumelos, o que impede a sua utilização de forma legal. Devido a isso, e à necessidade de evitar o uso de pesticidas, tem se buscado alternativas naturais para o controle de pragas e doenças. Os óleos essenciais tem ação antimicrobiana comprovada em diversos estudos e, por isso, podem ser uma boa alternativa para o controle de *L. fungicola* no Brasil. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar a ação antifúngica de diferentes óleos essenciais ou compostos majoritários sobre o crescimento micelial de *L. fungicola*. Para isto, 13 óleos essenciais e nove compostos majoritários foram testados *in vitro* quanto ao seu efeito sobre o crescimento micelial do fungo, utilizando o método de difusão em meio, nas concentrações de 1 e 0,1%. Alguns óleos ou compostos majoritários apresentaram apenas uma inibição parcial, a qual variou de 62 a 97%, dependendo da concentração utilizada (0,1 ou 1%). Entretanto, a maioria deles apresentou 100% de inibição do crescimento fúngico nas duas doses testadas. Portanto, os testes *in vitro* demonstraram um grande potencial desses compostos como agentes de controle de *L. fungicola* no cultivo de *A. bisporus*.

Palavras-chave: Doença da bolha seca; *Agaricus bisporus*; Cogumelos; Atividade antifúngica.

Abstract

The fungus *Lecanicillium fungicola* is the causative agent of dry bubble disease in white button mushroom (*Agaricus bisporus*), being responsible for economic losses. This pathogen causes spots and deformities in the mushrooms, making them unmarketable. Its control can be done with the use of fungicides, in addition to hygiene measures. However, in Brazil there is no approved pesticides for mushroom cultivation, which prevents its legal use. Because of this, and the need to avoid the use of pesticides, natural alternatives have been sought for the control of pests and diseases. Essential oils have proven antimicrobial action in several studies and, therefore, can be a good alternative for the control of *L. fungicola* in Brazil. Thus, the objective of this work was to evaluate the antifungal action of different essential oils and major compounds on the mycelial growth of *L. fungicola*. Therefore, 13 essential oils and nine major compounds were tested *in vitro* in order to evaluate the mycelial growth of the

fungus. The medium diffusion method was used at 1 and 0,1% concentrations. Some oils and major components showed only partial inhibition, which varied from 62 to 97%, depending on the concentration (1 or 0.1%). However, most of them showed 100% inhibition of fungal growth in the two doses tested. Therefore, in vitro tests demonstrated a great potential of these compounds as agents of control of *L. fungicola* in the cultivation of *A. bisporus*.

Keywords: Dry bubble disease; *Agaricus bisporus*; Mushroom; Antifungal activity.

Resumen

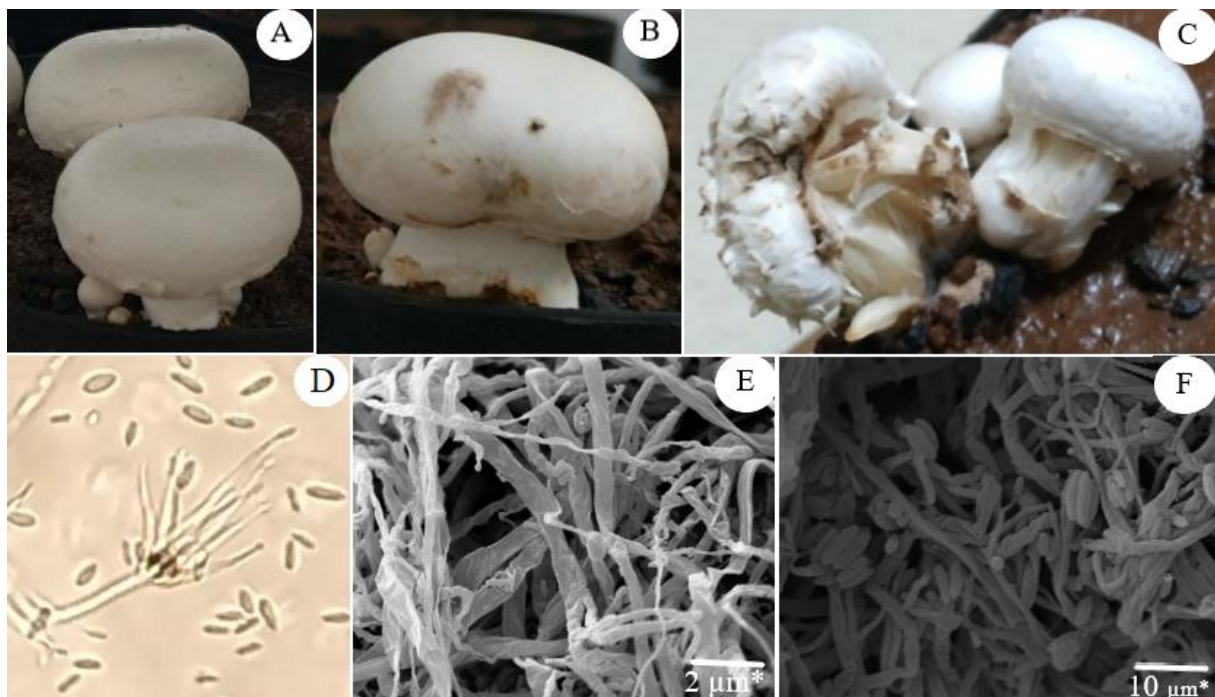
El hongo *Lecanicillium fungicola* es el agente causante de la enfermedad de la burbuja seca en los champiñones (*Agaricus bisporus*), responsable de las pérdidas económicas. Este patógeno causa manchas y deformidades en los hongos, lo que los hace inviables para su comercialización. Su control se puede hacer con el uso de fungicidas, además de medidas de desinfección. Sin embargo, en Brasil, no hay legislación vigente para el uso de pesticidas en los cultivos de hongos, lo que impide su uso legal. Debido a esto, y la necesidad de evitar el uso de pesticidas, se han buscado alternativas naturales para el control de plagas y enfermedades. Los aceites esenciales han demostrado su acción antimicrobiana en varios estudios y, por lo tanto, pueden ser una buena alternativa para el control de *L. fungicola* en Brasil. Así, el objetivo de este trabajo fue evaluar la acción antifúngica de diferentes aceites esenciales o compuestos principales sobre el crecimiento micelial de *L. fungicola*. Para ello, se probaron in vitro 13 aceites esenciales y nueve compuestos principales por su efecto sobre el crecimiento micelial del hongo, utilizando el método de difusión en medio de cultivo, en concentraciones de 1 y 0,1%. Algunos aceites o compuestos principales mostraron solo inhibición parcial, que varió de 62 a 97%, dependiendo de la concentración utilizada (0,1 o 1%). Sin embargo, la mayoría de ellos mostraron una inhibición del 100% del crecimiento de hongos en las dos dosis analizadas. Por lo tanto, las pruebas in vitro demostraron un gran potencial de estos compuestos como agentes de control de *L. fungicola* en el cultivo de *A. bisporus*.

Palabras clave: Enfermedad de la burbuja seca; *Agaricus bisporus*; Hongos; Actividad antifúngica.

1. Introdução

O fungo *Lecanicillium fungicola* é o agente causador da doença da bolha seca em cogumelos comestíveis, com destaque para a espécie *Agaricus bisporus*, causando perdas econômicas relevantes na fungicultura (Berendsen et al., 2010; Santana Nunes et al., 2017). A doença da bolha seca apresenta sintomas que variam de pequenas lesões necróticas a grandes deformidades disruptivas no píleo e no estipe, conforme apresentada na Figura 1. Essa patologia pode depreciar o preço de mercado do cogumelo a ponto de inviabilizar sua comercialização.

Figura 1. A: Cogumelos champignon (*A. bisporus*) saudáveis; B e C: champignon com sintomas da doença da bolha seca; D: imagem das estruturas morfológicas e esporos em microscópio óptico de *L. fungicola* (100x); E: Eletromicrografia de varredura de *A. bisporus* (2 μm); F: Eletromicrografia de varredura de *L. fungicola* (10 μm).



Fonte: Autores.

No Brasil, a fungicultura não possui regulamentação para o uso de pesticidas no controle de pragas e doenças, conseqüentemente, os agrotóxicos são utilizados de forma indiscriminada nessa atividade. Desse modo, o controle é realizado com pesticidas sem recomendações acuradas de dosagem, do estágio mais adequado para uso e sem avaliação de

possíveis impactos à saúde dos consumidores (Zied et al., 2015). Em função disso, a utilização de métodos alternativos, tais como o controle biológico e a utilização de produtos naturais, pode ser a melhor opção, especialmente para os produtores brasileiros, devido não haver regulamentação para o controle de pragas e doenças.

Os óleos essenciais possuem um grande potencial para o controle de patógenos. Essas substâncias são compostos voláteis, complexos e naturais, extraídos de plantas aromáticas. Esses metabólitos secundários são conhecidos por suas propriedades bactericida, antiviral, antifúngica, além de outras propriedades medicinais (Bakkali et al., 2008). Em função dessas propriedades, os óleos essenciais são amplamente utilizados para fins medicinais em diversas culturas há muitos anos. Recentemente, o uso dos óleos essenciais tem sido aplicado também na conservação de alimentos, além do uso clínico tradicional e na saúde (Donato et al., 2020).

Dentro desse contexto, a utilização de óleos essenciais em substituição aos agrotóxicos seria de grande valia para o mercado consumidor, cada vez mais consciente e exigente por alimentos saudáveis. Alicerçado no cenário exposto, o objetivo desse trabalho foi avaliar, *in vitro*, o potencial antifúngico de diferentes óleos essenciais e alguns compostos majoritários sobre o fungo *L. fungicola*.

2. Metodologia

2.1 Obtenção dos isolados de *Lecanicillium fungicola*

Duas das três cepas de *Lecanicillium fungicola* foram obtidas e isoladas de cogumelos apresentando sintomas da doença, coletados diretamente do local de cultivo, localizado em Barbacena – MG. A terceira cepa utilizada, foi cedida gentilmente pela Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Campus Dracena.

Para o isolamento, foram cortados fragmentos de basidiocarpos que apresentavam sintomas da doença. Cada fragmento utilizado continha uma parte afetada e uma parte sadia. Os fragmentos foram tratados com álcool 70% por 30 segundos; posteriormente foram tratados com hipoclorito à 2% por um minuto e, por fim, lavados com água destilada estéril por 3x. Após os tratamentos de assepsia, os fragmentos foram transferidos para placa de Petri contendo papel de filtro seco esterilizado, para absorção do excesso de água. Oito fragmentos foram depositados equidistantes em cinco placas de Petri contendo o meio de cultura. Dois meios de cultura foram utilizados para o isolamento dos fungos: BDA (batata 200g/L,

dextrose 20g/L e ágar 15g/L) e Ágar Malte (extrato de malte 20g/L e ágar 15g/L), ambos contendo os antibióticos cloranfenicol e estreptomicina, ambos a 50µg/mL. Após a transferência, as placas foram incubadas a 25°C até o crescimento do patógeno a partir dos fragmentos. As culturas obtidas foram transferidas para novas placas de Petri contendo BDA e, após a formação de conídios, lâminas foram preparadas para observação das estruturas reprodutivas assexuadas. Após a confirmação do gênero *Lecanicillium*, foram obtidas culturas monospóricas para a sequência do trabalho. Para isto, foi preparada uma suspensão de esporos em água destilada estéril. Após diluições sucessivas, alíquotas de 100 µL foram transferidas para placas contendo ágar-ágar 2%. As placas foram observadas através de microscópio óptico e os conídios que se encontravam mais isolados foram transferidos unitariamente com auxílio de uma agulha para uma placa contendo meio Ágar Malte. Após o crescimento das culturas monospóricas, os isolados foram mantidos por meio de repicagens sucessivas em meio BDA e Ágar Malte e incubados a 25°C.

2.2 Identificação molecular

A massa micelial do fungo foi obtida em meio Caldo Malte, após inoculação com uma suspensão de 10^6 conídios/mL⁻¹, e incubação por 5 dias a 25° C, sob agitação de 100 RPM. A massa micelial foi filtrada e lavada com água destilada. A extração de DNA foi realizada com Kit Wizard Genomic DNA (Promega), de acordo com as recomendações do fabricante. O DNA extraído foi utilizado para amplificação da região ribossomal, utilizando-se como iniciadores os primers ITS5 (5' GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG3') e ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3') (White et al., 1990).

2.3 Obtenção da suspensão de esporos para os ensaios

Placas com meio BDA foram inoculadas com um disco de cultura do fungo no centro da placa e incubadas a 25° C até a completa colonização. Para cada placa, foram adicionados 15 mL de água destilada estéril sobre a cultura do fungo. Os conídios foram raspados com auxílio de lâmina de vidro estéril e coletados com auxílio de micropipeta. Após contagem em câmara de Neubauer, a suspensão de esporos teve a sua população ajustada para se obter a concentração final de $1,6 \times 10^7$ esporos mL⁻¹. A suspensão foi armazenada a 4°C até ser utilizada.

2.4 Ensaio antifúngico *in vitro*

Os óleos essenciais foram adquiridos da empresa Ferquima[®] (Ind. e Com. Ltda) e estão descritos na Tabela 1, juntamente com os compostos majoritários (Sigma-Aldrich[®]): α -terpinol, Carvacrol, Citral, Eugenol puríssimo, Geraniol, Lilanol, Terpinen-4-ol, Timol e trans-Cinnamaldehyde 99%.

Como testemunhas (sem óleo essencial), foram realizados dois controles: o primeiro, com o crescimento do fungo somente no meio BDA e o segundo, com o desenvolvimento do fungo em meio BDA acrescido de Tween 80 a 0,5%, com o objetivo de avaliar a influência do surfactante sobre o crescimento do fungo. Portanto, cada experimento foi composto por 22 tratamentos (13 tipos de óleo essencial e 9 compostos majoritários) e duas testemunhas, com 5 repetições.

O óleo essencial foi adicionado ao meio BDA liquefeito após ser resfriado até 45°C, em volume suficiente para se obter a concentração desejada (1 ou 0,1%). Após homogeneização, o meio foi vertido em placas de Petri, as quais foram posteriormente inoculadas com um disco de 9 mm contendo o micélio de *L. fungicola* no centro de cada placa. As placas controle, sem adição de óleo essencial, foram inoculadas seguindo o mesmo procedimento. Em seguida, as placas foram incubadas a 25°C até a colonização da placa controle, ou seja, em torno de 15 dias. O diâmetro das colônias foi registrado diariamente por meio de um paquímetro digital. Os cálculos para determinação do efeito de inibição de cada óleo ou composto foram feitos com base no diâmetro das colônias em comparação ao controle. A porcentagem de inibição (PI) foi calculada conforme Billerbeck et al. (2001): $PI = (C - T / C - 9) \times 100$, sendo C= diâmetro médio do micélio no controle; T= diâmetro médio do micélio no tratamento.

Tabela 1. Nomenclatura das plantas de origem dos óleos essenciais usados nesse trabalho.

Nome científico	Nome popular	Composto majoritários
<i>Citrus aurantifolia</i>	Limão Tahiti	Geranial, limoneno e β -pineno (Chao et al., 2000)
<i>Cymbopogon martinii</i>	Palmarosa	Acetato de geranil e geraniol (Chao et al., 2000)
<i>Cymbopogon winterianus</i>	Citronela	Citronelal, citronelol e geraniol (Horváth et al., 2016)
<i>Eugenia caryophyllus</i>	Cravo	Eugenol e β -cariofileno (Horváth et al., 2016)
<i>Eugenia caryophyllus</i> (folha)	Cravo folha	Eugenol e β -cariofileno (Horváth et al., 2016)
<i>Litsea cubeba</i>	Pimenta chinesa, May Chang	Sabineno, 1,8 – cineol, α -pineno e β -pineno (Thielmann and Muranyi, 2019)
<i>Mentha arvensis</i>	Hortelã	Menthol e <i>p</i> - menthone (Pandey et al., 2003)
<i>Mentha piperita</i>	Hortelã-pimenta	Sabineno, limoneno, α -pineno e β -pineno e β -cariofileno (Chao et al., 2000)
<i>Ocimum basilicum</i>	Manjeriçao	Metilchavicol (Císarová et al., 2016)
<i>Origanum vulgare</i>	Orégano	Carvacrol (Císarová et al., 2016)
<i>Piper nigrum</i>	Pimenta preta	Sabineno, limoneno, α -pineno e β -pineno e β -cariofileno (Chao et al., 2000)
<i>Thymus vulgaris</i>	Tomilho	Timol, <i>p</i> -Cymene e 1,8 – cineol (Horváth et al., 2016)
<i>Zingiber officinale</i>	Gengibre	Canfeno, neral, geranial + acetato de bornila (Chao et al., 2000)

Fonte: Autores.

2.5 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM)

A CIM dos óleos essenciais sobre *L. fungicola* foi realizada por meio de microdiluição seriada em microplaca de 96 poços. As doses testadas foram definidas a partir dos resultados do teste *in vitro* descrito anteriormente.

Para cada dose testada, foram realizadas três repetições em caldo BD (batata e dextrose) 2x concentrado, contendo Tween 80 0,5% como surfactante. Como controle, foi utilizado um tratamento sem óleo essencial. A microdiluição seriada em microplaca foi realizada adicionando 200 µL de meio BD acrescido do óleo essencial a ser testado a 1% em cada poço, na primeira linha (de 1 a 12), com exceção dos poços 1, 5 e 9. Foram realizadas diluições seriadas (partindo da linha A para H) com 100 µL da solução, desprezando 100 µL do último poço, de forma que todos os poços contivessem o mesmo volume (100 µL). Nas colunas 1, 5 e 9 foi adicionado apenas o meio BD e a suspensão de esporos como controle, sem óleo. Após a diluição seriada, foram adicionados 10 µL da suspensão de esporos de *L. fungicola* em cada poço. Por fim, as placas foram incubadas a 25°C por 1, 2, 3, 7 e 15 dias, com intervalos exatos de 24h.

Após o período de incubação, a interpretação dos resultados foi realizada por análise visual. A CIM foi definida como a menor concentração de óleo essencial em que não ocorreu crescimento fúngico (Yamaguchi et al., 2011). Para determinar a CFM, foi realizado o subcultivo, transferindo 10 µL da cultura de cada poço negativo e do controle positivo em meio BDA, conforme Nakamura et al. (2016).

2.6 Análise estatística

As variáveis obtidas nos testes foram analisadas por meio do programa estatístico SISVAR[®], com análise de variância e comparação de médias pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância, em delineamento experimental inteiramente casualizado, assim como para a interação (dose x tempo) (Ferreira, 2014).

3. Resultados e Discussão

Sequências ITS foram geradas para os três isolados (LTL01, LTL02, LTL03), as quais foram alinhadas e comparadas com as sequências ITS dos isolados de referência de espécies de *Lecanicillium*. Os três isolados se agruparam junto ao isolado tipo da espécie *L. fungicola* var. *aleophilum* (CBS 992.69 – Origem: Holanda). Portanto, os isolados utilizados neste trabalho pertencem à espécie *L. fungicola* var. *aleophilum*, comumente encontrada em cultivos de *Agaricus bisporus*.

Para avaliar o efeito dos óleos essenciais a 1% e do tempo de incubação sobre o crescimento micelial de *L. fungicola*, os testes foram realizados com as três cepas (LTL01, LTL02 e LTL03), descritas anteriormente. Nos resultados pode ser visto que houve efeito

inibitório significativo dos diferentes óleos essenciais, o qual variou de acordo com o tempo de incubação, para alguns tipos de óleo, indicando que o efeito inibitório de alguns óleos está limitado a um período mais curto de tempo.

Conforme demonstrado na Tabela 2, a grande maioria dos óleos apresentou 100% de inibição sobre o crescimento micelial de *L. fungicola*. Dos 22 tratamentos, 20 apresentaram 100% de inibição na concentração de 1%, enquanto que destes, apenas 14 apresentaram 100% de inibição na concentração de 0,1%.

Ao final do período de incubação (15 dias), observou-se que os óleos essenciais de *Piper nigrum* e *Zingiber officinale* apresentaram 62% e 65% de inibição, respectivamente.

Tabela 2. Inibição dos óleos essenciais e compostos majoritários sobre o crescimento micelial de *L. fungicola* nas concentrações testadas.

Espécie de origem do óleo ou componente principal	Concentração	
	1%	0,1%
α -terpinol	+	+
Carvacrol	+	+
Citral	+	+
<i>Citrus aurantifolia</i>	+	-
<i>Cymbopogon martinii</i>	+	+
<i>Cymbopogon winterianus</i>	+	+
<i>Eugenia caryophyllus</i>	+	+
<i>Eugenia caryophyllus</i> (folha)	+	+
Eugenol puríssimo	+	+
Geraniol	+	+
Lilanol	+	-
<i>Litsea cubeba</i>	+	+
<i>Mentha arvensis</i>	+	-
<i>Mentha piperita</i>	+	-
<i>Ocimum basilicum</i>	+	-
<i>Origanum vulgare</i>	+	+
<i>Piper nigrum</i>	-	-
Terpinen-4-ol	+	-
<i>Thymus vulgaris</i>	+	+
Timol	+	+
trans-Cinnamaldehyde 99%	+	+
<i>Zingiber officinale</i>	-	-

Fonte: Autores.

Analisando esses resultados, percebe-se a importância de, mesmo que um óleo já tenha sido testado em outros lugares, reavaliar o tratamento, uma vez que pode haver diferenças na constituição dos óleos, que sofrem alterações de acordo com as condições ambientais e até mesmo da forma e horário de coleta da planta, além da possibilidade de que uma determinada espécie apresente variações genéticas que levem a uma maior tolerância àquele produto.

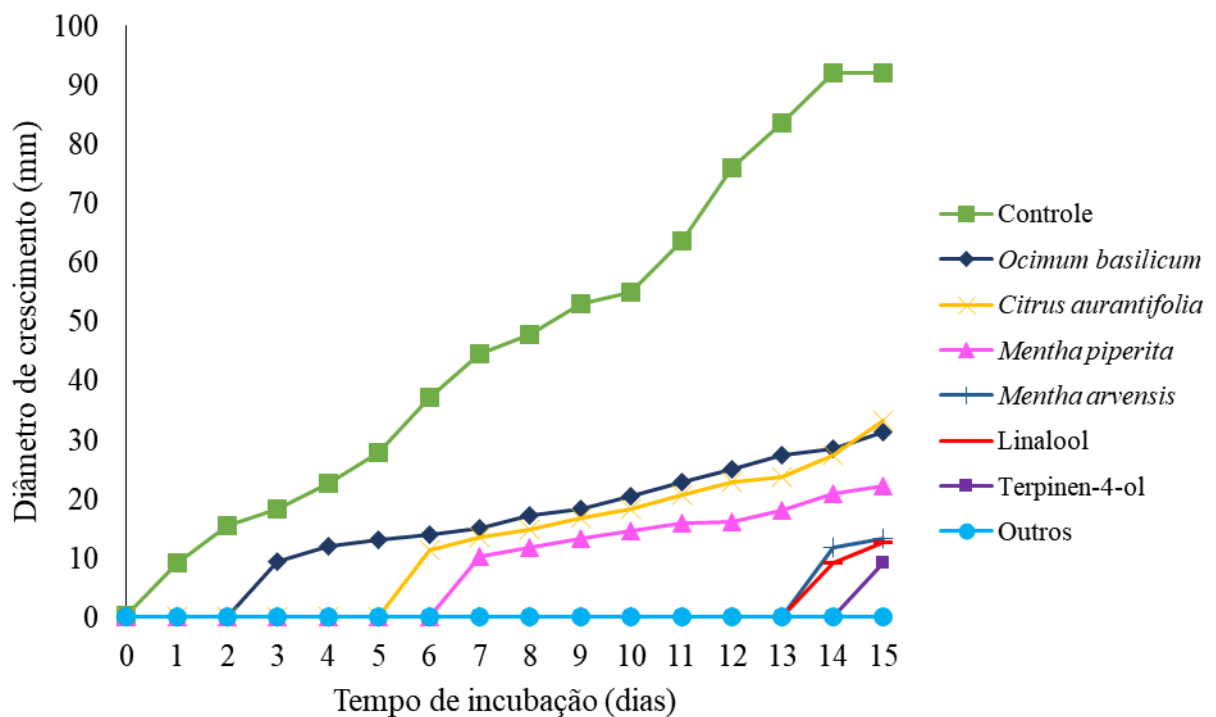
Portanto, para obter óleos essenciais de composição constante, Bakkali et al. (2008) sugerem que eles devem ser extraídos do mesmo modo, das mesmas partes das plantas que cresce no mesmo solo, em condições climáticas idênticas e colhidas na mesma estação.

3.1 Teste *in vitro* dos óleos essenciais, na concentração de 0,1%

A Figura 2 apresenta os resultados da dinâmica de crescimento micelial de *L. fungicola* e do efeito dos óleos ou de seus compostos majoritários. Ao contrário do que ocorreu com o controle, é possível observar que, em nenhum dos tratamentos, ocorreu o início imediato do crescimento micelial do fungo. O menor efeito inibitório foi observado no tratamento com o óleo essencial de *Ocimum basilicum*, para o qual observou-se início do crescimento micelial no 3º dia de incubação, seguido por *Citrus aurantifolia* e *Mentha piperita*, os quais inibiram o crescimento micelial conforme o gráfico, até 5º e 6º dias, respectivamente. Para *Mentha arvensis*, linalol e terpinen-4-ol, o crescimento micelial iniciou-se apenas a partir do 13º dia, mostrando um forte efeito inibitório sobre o crescimento do fungo. Não se sabe porque o fungo supera o efeito inibitório desses compostos após todo esse período de incubação. A possibilidade mais óbvia seria o efeito da volatilização do(s) composto(s) responsável(is) pela inibição do crescimento micelial, devido ao fato que a principal característica dos óleos essenciais é serem constituídos por componentes voláteis, e com o passar do tempo esses componentes vaporizam. Poderia ser que, pelo menos um desses compostos não seja um composto majoritário e acabe desaparecendo durante o período de incubação. Entretanto, se fosse apenas isso, o mesmo comportamento não seria observado para os compostos majoritários testados, o que não foi o caso, uma vez que dois deles também não apresentaram 100% de inibição na concentração de 0,1% (Tabela 2). Outra possibilidade poderia ser uma adaptação fisiológica do fungo ao composto. Entretanto, a adaptação fisiológica não deveria ser esperada, uma vez que o óleo essencial não tem um único alvo na célula, mas afeta vários alvos celulares ao mesmo tempo (Bakkali et al., 2008). Apesar disso, estes autores relataram um caso de resistência de *Bacillus cereus* ao composto carvacrol após

o crescimento da bactéria na presença de doses subletais. Portanto, apesar do acentuado efeito inibitório, provocando um grande retardo no início do crescimento micelial do patógeno, pode ser que a utilização desses compostos possa ser bastante limitada, em função dessas possibilidades.

Figura 2. Dinâmica do crescimento micelial de *L. fungicola* sob o efeito dos óleos essenciais a 0,1%.



Fonte: Autores.

Os óleos essenciais apresentam, geralmente, um amplo espectro de ação, proporcionando a inibição ou morte dos mais distintos gêneros de fungos e bactérias (Bakkali et al., 2008; Gogoi et al., 1997; Horváth et al., 2016; Lee et al., 2020; Sharma et al., 2017; Thielmann and Muranyi, 2019). Isso significa que estruturas comuns a todas as espécies, como, por exemplo, a membrana plasmática, sejam afetadas, ou estruturas comuns a determinados grupos de microrganismos, como a membrana mitocondrial em eucariotos ou a bomba de prótons em procariotos (Bakkali et al., 2008). Este amplo espectro de ação traz um problema que é a dificuldade de encontrar um produto que seja mais específico, para não afetar outros organismos, como é o caso do cultivo de cogumelos. Neste caso, o ideal é que se tenha um óleo que iniba o patógeno, mas não a espécie de cogumelo cultivada. Considerando

que o patógeno em questão e o cogumelo cultivado pertencem ao grupo dos fungos, isso pode ser mais complicado, porém, há o atenuante de que as duas espécies pertencem a divisões distintas, Ascomycota e Basidiomycota, respectivamente. Neste contexto, a avaliação de diferentes tipos de óleos que contenham diferentes constituintes majoritários é essencial para se alcançar uma ação seletiva sobre o patógeno.

Para a grande maioria dos óleos, senão a sua totalidade, dois ou três componentes majoritários são responsáveis por mais de 50% da sua composição e, às vezes, apenas um componente corresponde a 50% ou mais da sua composição. Para o óleo essencial de *Litsea cubeba*, os compostos neral e geranial são os componentes majoritários, com 40,7 e 51,9%, respectivamente (Gogoi et al., 1997). Entretanto, esses valores são variáveis, provavelmente, em função de diferenças metodológicas, mas também em função das diferenças dos lotes de óleo utilizados, as quais são, por sua vez, oriundas das diferenças de cultivares, solo, clima, etc. Si et al. (2012) relataram para os mesmos componentes (neral e geranial) valores de 36,3 e 50%, respectivamente. No caso específico de *Litsea cubeba*, observa-se ainda uma grande diferença entre as partes da planta utilizadas para a extração do óleo. Segundo Jirovetz et al., (2006), eugenol foi o principal componente majoritário do óleo obtido a partir das folhas de *Litsea cubeba*. Para o óleo essencial de *C. winterianus*, citronelol, citronelal e geraniol são os principais componentes majoritários, com 10,1; 27 e 22,8%, respectivamente (Simic et al., 2008). Entretanto, para os mesmos componentes, Horváth et al. (2016) relataram os valores de 13,6; 36,2 e 25,3%, enquanto que Hamzah et al. (2014) encontraram um valor de 42,4% para o geraniol, o qual destacou-se como o principal componente majoritário. Esses resultados reforçam a necessidade contínua de retestar o efeito dos óleos essenciais, mesmo para os mesmos grupos de microrganismos. Posteriormente, a identificação de componentes majoritários com inibição seletiva sobre o patógeno poderá trazer uma contribuição ainda maior sobre a utilização dos óleos essenciais como uma alternativa de controle de pragas e doenças no cultivo de cogumelos. Entretanto, isso vai depender do custo que isso poderá representar.

No trabalho de Santos et al. (2017), a concentração inibitória mínima do óleo essencial de *Thymus vulgaris* encontrada para o controle de *L. fungicola* foi de 0,8%. Este valor é superior à dose encontrada neste trabalho, uma vez que a concentração de 0,1% do óleo essencial de *Thymus vulgaris* inibiu completamente o crescimento de *L. fungicola*. Geösel et al. (2014) testaram a concentração de 0,015% do óleo essencial de tomilho contra *L. fungicola* e após 10 dias de observação, observou-se um crescimento micelial de 34 mm.

3.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM)

Este ensaio foi realizado a partir dos óleos essenciais que apresentaram 100% de inibição do crescimento micelial de *L. fungicola* na concentração de 0,1%. A CIM é muito importante para a obtenção da maior eficácia possível no controle do patógeno, sem afetar o cogumelo e ao menor custo possível. Não se observou crescimento micelial nas microplacas até 72h de incubação (3 dias). Em função disso, as primeiras observações de crescimento micelial foram feitas a partir do período de 7 dias de incubação (Tabela 3), de acordo com a metodologia descrita anteriormente.

O óleo essencial de *L. cubeba* foi o que apresentou os melhores resultados de CIM e CFM, seguido por *E. caryophyllus* (folha), *E. caryophyllus* (cravo) e *Cymbopogon martinii*, todos com uma CIM $\geq 0,0312\%$. Para os óleos essenciais de *O. vulgare* e *T. vulgaris*, observou-se a CIM no dobro da concentração. Apesar disso, esses resultados representam uma eficiência maior em comparação aos resultados de Santos et al. (2017), cuja CIM observada foi de 0,8%. Geösel et al. (2014) testaram a concentração de 0,015% do óleo essencial de *T. vulgaris*, entretanto, essa concentração não foi suficiente para inibir completamente o crescimento micelial do fungo.

Tabela 3. Resultados de CIM e CFM para os óleos essenciais testados para o controle de *L. fungicola*.

Óleos essenciais	Cepas: LTL01, LTL02 e LTL03		
	CIM		CFM
	7 dias	15 dias	5 dias
<i>Cymbopogon winterianus</i>	$\geq 0,125\%$	$\geq 0,125\%$	$\geq 0,25\%$
<i>Cymbopogon martinii</i>	$\geq 0,0312\%$	$\geq 0,0625\%$	$\geq 0,125\%$
<i>Eugenia caryophyllus</i>	$\geq 0,0312\%$	$\geq 0,0625\%$	$\geq 0,0625\%$
<i>Eugenia caryophyllus</i> folha	$\geq 0,0312\%$	$\geq 0,0312\%$	$\geq 0,125\%$
<i>Litsea cubeba</i>	$\geq 0,0156\%$	$\geq 0,0156\%$	$\geq 0,0312\%$
<i>Mentha arvensis</i>	$\geq 0,125\%$	$\geq 0,5\%$	$\geq 0,5\%$
<i>Origanum vulgare</i>	$\geq 0,0625\%$	$\geq 0,0625\%$	$\geq 0,0625\%$
<i>Thymus vulgaris</i>	$\geq 0,0625\%$	$\geq 0,125\%$	$\geq 0,125\%$

Fonte: Autores.

Os índices CIM/CFM são extremamente importantes para a escolha das melhores opções visando uma aplicação comercial dos óleos essenciais. Entretanto, junto com a CIM/CFM, é necessário avaliar também o preço do produto comercial para definir o custo relativo de cada produto. Para os 4 óleos com os melhores índices (*L. cubeba*, *E. caryophyllus* – folha, *E. caryophyllus* e *C. martinii*), *C. martinii* foi o de maior custo no mercado (R\$1040,00 – 100 mL), seguido por *E. caryophyllus* (R\$840,00), *L. cubeba* (R\$756,00) e *E. caryophyllus* – folha (R\$567,00). É interessante observar que o óleo de *E. caryophyllus* – folha apresentou menor preço e menor CIM quando comparado com o óleo de *E. caryophyllus*, após 15 dias de incubação.

Considerando os preços observados no mercado brasileiro e os índices CIM/CFM observados, os cálculos mostraram que, apesar de não ser o óleo mais barato, *L. cubeba* apresentou o menor custo relativo, despontando como uma das principais opções para o controle de *L. fungicola*. Entretanto, estudos futuros deverão avaliar ainda a efetividade deste óleo nas condições de cultivo do cogumelo.

4. Considerações Finais

Os resultados mostram que os óleos essenciais testados têm ação contra o *L. fungicola*, dos 13 diferentes óleos essenciais testados *L. Cubeba* foi o mais efetivo, com Concentração Inibitória Mínima de $\geq 0,0156\%$ e Concentração Fungicida Mínima de $\geq 0,0312\%$, seguido por *E. caryophyllus* e *O. vulgare*, com valores de CIM e CFM $\geq 0,0625\%$. Portanto, a maioria dos óleos essenciais testados foram efetivos contra *L. fungicola* e alguns deles podem ser utilizados como alternativas eficientes para combater a doença causada por este fungo.

Referências

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils - A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 446–475.

<https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>

Berendsen, R. L., Baars, J. J. P., Kalkhove, S. I. C., Lugones, L. G., Wösten, H. A. B., & Bakker, P. A. H. M. (2010). *Lecanicillium fungicola*: Causal agent of dry bubble disease in white-button mushroom. *Molecular Plant Pathology*, 11(5), 585–595.

<https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2010.00627.x>

Billerbeck, V. G., Roques, C. G., Bessi re, J. M., Fonvieille, J. L., & Dargent, R. (2001). Effects of *Cymbopogon nardus* (L.) W. Watson essential oil on the growth and morphogenesis of *Aspergillus niger*. *Canadian Journal of Microbiology*, 47(1), 9–17. <https://doi.org/10.1139/cjm-47-1-9>

Chao, S. C., Young, D. G., & Oberg, C. J. (2000). Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses. *Journal of Essential Oil Research*, 12(5), 639–649. <https://doi.org/10.1080/10412905.2000.9712177>

C sarova, M., Tan inova, D., Medo, J., & Ka aniova, M. (2016). The in vitro effect of selected essential oils on the growth and mycotoxin production of *Aspergillus* species. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 51(10), 668–674. <https://doi.org/10.1080/03601234.2016.1191887>

Donato, R., Sacco, C., Pini, G., & Bilia, A. R. (2020). Antifungal activity of different essential oils against *Malassezia* pathogenic species. In *Journal of Ethnopharmacology* (Vol. 249, p. 112376). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112376>

Ferreira, D. F. (2014). Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. *Ci ncia e Agrotecnologia*, 38(2), 109–112. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542014000200001>

Ge sel, A., Szab , A., Akan, O., & Szarvas, J. (2014). *Effect of Essential Oils on Mycopathogens of Agaricus*. 530–535.

Gogoi, P., Baruah, P., & Nath, S. C. (1997). Antifungal activity of the essential oil of *Litsea cubeba* pers. *Journal of Essential Oil Research*, 9(2), 213–215. <https://doi.org/10.1080/10412905.1997.9699462>

Hamzah, M. H., Che Man, H., Abidin, Z. Z., & Jamaludin, H. (2014). Comparison of citronella oil extraction methods from *Cymbopogon nardus* grass by ohmic-heated hydro-distillation, hydro-distillation, and steam distillation. *BioResources*, 9(1), 256–272. <https://doi.org/10.15376/biores.9.1.256-272>

Horváth, G., Török Jenei, J., Vágvölgyi, C., Böszörményi, A., & Krisch, J. (2016). Effects of essential oil combinations on pathogenic yeasts and moulds. *Acta Biologica Hungarica*, 67(2), 205–214. <https://doi.org/10.1556/018.67.2016.2.8>

Jirovetz, L., Buchbauer, G., Stoilova, I., Stoyanova, A., Krastanov, A., & Schmidt, E. (2006). Chemical Composition and Antioxidant Properties of Clove Leaf Essential Oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(17), 6303–6307. <https://doi.org/10.1021/jf060608c>

Lee, L. T., Garcia, S. A., Martinazzo, A. P., & Teodoro, C. E. D. S. (2020). Fungitoxidade e composição química do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) sobre o *Aspergillus flavus*. *Research, Society and Development*, 9(8), 202985628. <https://doi.org/10.33448/rsd-v9i8.5628>

Nakamura, M., Endo, E., de Sousa, J. P., Callejon, D., Ueda-Nakamura, T., Dias Filho, B., de Freitas, O., Nakamura, C., & Lopes, N. (2016). Copaiba Oil and Its Constituent Copalic Acid as Chemotherapeutic Agents against Dermatophytes. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 28(8), 1377–1383. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20160309>

Pandey, A. K., Rai, M. K., & Acharya, D. (2003). Chemical Composition and Antimycotic Activity of the Essential Oils of Corn Mint (*Mentha arvensis*) and Lemon Grass (*Cymbopogon flexuosus*) Against Human Pathogenic Fungi. *Pharmaceutical Biology*, 41(6), 421–425. <https://doi.org/10.1076/phbi.41.6.421.17825>

Santana Nunes, J., Rocha de Brito, M., Cunha Zied, D., Aparecida das Graças Leite, E., Souza Dias, E., & Alves, E. (2017). Evaluation of the infection process by *Lecanicillium fungicola* in *Agaricus bisporus* by scanning electron microscopy. *Revista Iberoamericana de Micología*, 34(1), 36–42. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2016.04.006>

Santos, T. L. dos, Belan, L. L., Zied, D. C., Dias, E. S., Alves, E., Santos, T. L. dos, Belan, L. L., Zied, D. C., Dias, E. S., & Alves, E. (2017). Essential oils in the control of dry bubble disease in white button mushroom. *Ciência Rural*, 47(5). <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20160780>

- Sharma, A., Rajendran, S., Srivastava, A., Sharma, S., & Kundu, B. (2017). Antifungal activities of selected essential oils against *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici 1322, with emphasis on *Syzygium aromaticum* essential oil. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 123(3), 308–313. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2016.09.011>
- Si, L., Chen, Y., Han, X., Zhan, Z., Tian, S., Cui, Q., & Wang, Y. (2012). Chemical composition of essential oils of *Litsea cubeba* harvested from its distribution areas in China. *Molecules*, 17(6), 7057–7066. <https://doi.org/10.3390/molecules17067057>
- Simic, A., Rančić, A., Sokovic, M. D., Ristic, M., Grujic-Jovanovic, S., Vukojevic, J., & Marin, P. D. (2008). Essential oil composition of *Cymbopogon winterianus* and *Carum carvi* and their antimicrobial activities. *Pharmaceutical Biology*, 46(6), 437–441. <https://doi.org/10.1080/13880200802055917>
- Thielmann, J., & Muranyi, P. (2019). Review on the chemical composition of *Litsea cubeba* essential oils and the bioactivity of its major constituents citral and limonene. *Journal of Essential Oil Research*, 31(5), 361–378. <https://doi.org/10.1080/10412905.2019.1611671>
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal Rna Genes for Phylogenetics. *PCR Protocols*, 1, 315–322. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-372180-8.50042-1>
- Yamaguchi, M. U., Garcia, F. P., Cortez, D. A. G., Ueda-Nakamura, T., Filho, B. P. D., & Nakamura, C. V. (2011). Antifungal effects of Ellagitannin isolated from leaves of *Ocotea odorifera* (Lauraceae). *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 99(3), 507–514. <https://doi.org/10.1007/s10482-010-9516-3>
- Zied, D. C., Nunes, J. S., Nicolini, V. F., Gimenez, A. P., Rinker, D. L., & Dias, E. S. (2015). Tolerance to *Lecanicillium fungicola* and yield of *Agaricus bisporus* strains used in Brazil. *Scientia Horticulturae*, 190, 117–122. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.04.021>

Porcentagem de contribuição de cada autor no manuscrito

Lundoi Tobias Lee – 30%

Lívia Martinez Abreu Soares Costa – 10%

Tatiana Silveira Junqueira de Moraes – 10%

Cibelli Paula de Castro – 10%

Lucas de Camargo Souza – 10%

Roberta Hilsdorf Piccoli -10 %

Eustáquio Souza Dias - 20%