



# Bioatividade do óleo essencial de *Eugenia caryophyllus* sobre *Cladosporium herbarum*, agente etiológico da verrugose em maracujá

Bioactivity of the essential oil of *Eugenia caryophyllus* against *Cladosporium herbarum*, etiological agent of black scab in passion fruit

A. R. de Figueiredo<sup>1\*</sup>; L. R. da Silva<sup>1</sup>; L. A. S. de Moraes<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 23890-000, Seropédica-RJ, Brasil

<sup>2</sup>EMBRAPA Agrobiologia, 23897-970, Seropédica-RJ, Brasil

\*ana.agroambiente@gmail.com

(Recebido em 26 de julho de 2020; aceito em 24 de fevereiro de 2021)

Os óleos essenciais extraídos de plantas exibem funções ecológicas importantes demonstradas através de diversos estudos, com potencial para serem utilizados como agentes antimicrobianos naturais em substituição aos pesticidas convencionais. O objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* a fungitoxidade do óleo essencial de *Eugenia caryophyllus* Tumb, em diferentes concentrações, contra o crescimento micelial de *Cladosporium herbarum*, agente etiológico da doença conhecida como “verrugose” que afeta todos os órgãos aéreos do maracujazeiro, reduzindo seriamente a produtividade, o suprimento, os preços e a qualidade da fruta. A partir de frutos e flores, o fungo foi isolado, recuperado e analisado em batata-dextrose-ágar (BDA) com os tratamentos 12,8; 6,4; 3,2; 1,6; 0,8; 0,4 e 0,2 µL de óleo essencial de *E. caryophyllus*. O óleo essencial de *E. caryophyllus* inibiu o crescimento micelial de *C. herbarum* a partir da concentração de 1,6 µL e apresentou uma inibição micelial total na concentração de 12,8 µL. Assim, o óleo essencial de *E. caryophyllus* apresentou-se promissor para aplicações futuras como agente biofungicida contra *C. herbarum*.  
Palavras-chave: crescimento micelial, *Passiflora edulis*, verrugose

Essential oils extracted from plants exhibit important ecological functions in several studies, with potential to be used as natural antimicrobial agents to substitute to conventional products. The objective this study was to evaluate the *in vitro* the fungitoxity of the essential oil of *Eugenia caryophyllus* Tumb in different concentrations against the mycelial growth of *Cladosporium herbarum*, etiological agent that incites a serious disease in passion fruit, known as “black scab” that affects all aerial organs of the plant, reducing seriously productivity, supply, prices and quality of the fruit. From fruits and flowers, the fungus was isolated, recover, and analyzed in potato dextrose agar (PDA) with the treatments 12,8; 6,4; 3,2; 1,6; 0,8; 0,4 e 0,2 µL of the essential oil of *E. caryophyllus*. The essential oil of *E. caryophyllus* inhibited of the mycelial growth of the *C. herbarum* from concentration of 1.6 µL and showed a total mycelial inhibition in the concentration of 12.8 µL. Thus, *E. caryophyllus* essential oil has shown its promising for future applications as a biofungicidal agent against *C. herbarum*.

Keywords: mycelial growth, *Passiflora edulis*, black scab

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil é atualmente o maior produtor e consumidor mundial de maracujá, que pode ser cultivado em praticamente todas as regiões e estados no país, apresentando grande importância econômica e social com geração de emprego e renda [1]. Contudo, a produção de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims) é severamente afetada por várias doenças causadas por patógenos fúngicos, bacterianos e virais [2].

Entre as doenças que acometem a cultura do maracujá têm-se a verrugose, cancrose ou cladosporiose do maracujazeiro, como é popularmente conhecida a doença causada pelo fungo *Cladosporium herbarum*, que acarreta sérios problemas fitossanitários à cultura com danos em folhas, flores e frutos. Sob condições de viveiro ou casa de vegetação, a elevada população de plantas favorece um microclima úmido, desta forma há condições para uma rápida disseminação da doença, ocasionando queima, necrose da parte aérea das mudas e morte, com consequente redução de stand [3]. Os pomares com problemas drásticos principalmente de cancrose, quando a

doença ataca folhas e flores ou verrugose em frutos, no período de pleno desenvolvimento vegetativo do maracujazeiro aliado à alta temperatura favorece epidemias, independente de molhamento foliar. Como consequência há perdas na produção e na qualidade dos frutos, que apesar de não terem a polpa deteriorada, ficam sem valor para o consumo in natura [4].

A forma mais comum de disseminação da cladosporiose em maracujazeiro é por meio de muda infectada [5]. Deste modo, a redução da densidade de inóculo do fitopatógeno no pomar é importante. Além do uso de mudas saudáveis, os restos culturais devem ser destruídos pela aplicação de medidas que acelerem a sua decomposição. Atualmente, o controle de doenças de parte aérea tem sido realizado por meio do uso de fungicidas, com um elevado número de pulverizações, em média de 16 a 36 aplicações por ciclo, o que acarreta risco de seleção de populações do patógeno resistentes [6]. Diversos estudos alertam para o perigo dos resíduos de pesticidas nos ecossistemas desequilibrando a microflora nativa do solo e ainda, como contaminantes em alimentos ocasionando, assim, problemas altamente prejudiciais à saúde. De acordo com o monitoramento do Programa de Avaliação de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), resíduos de pesticidas têm sido detectados em frutas [7, 8]. Outra preocupação é a deriva agrícola como fonte de contaminação, o que contribui para exposição a pesticidas principalmente da população que vive próximo aos campos de cultivo, assim como, danos ambientais, a exemplo da contaminação pela presença de diferentes pesticidas detectados em análises bioquímicas no Rio Uruguai e nos tecidos de peixes [9, 10].

Para sistemas agroecológicos ou orgânicos de produção surge a necessidade de novas terapias, que promovam a segurança alimentar e nutricional, com substâncias mais eficazes e menos tóxicas ao homem e ao meio ambiente, a partir de fontes naturais, sustentáveis, em substituição aos produtos químicos sintéticos [11]. Nesse cenário, compostos aromáticos voláteis das plantas, como os óleos essenciais, produtos naturais originados por meio do metabolismo secundário das plantas possuem atividade antifúngica com grande potencial de uso no controle de fitopatógenos [12]. Suas propriedades antimicrobianas se devem à sua composição química, sendo os seus compostos voláteis [13] produzidos como parte importante do sistema de defesa das plantas contra ataques de patógenos e estresses ambientais. O acúmulo desses compostos pode ser influenciado por vários fatores genéticos, ontogenéticos, morfológicos e ambientais [14]. Neste contexto, a busca por produtos naturais como os compostos derivados de plantas no manejo de fitopatógenos surge com expectativas de sucesso no controle, sem danos aos ecossistemas.

*Eugenia caryophyllus* Tumb, pertence à família Myrtaceae, comumente conhecida como cravo-botão, é uma árvore aromática nativa da Indonésia, sendo usada como tempero na culinária de diversas partes no mundo. Estudos farmacológicos têm relatado *E. caryophyllus* como potente antifúngico, anti-inflamatório, analgésico, antioxidante, antitrombótico, antipirético, anticonvulsivante, inseticida, antimutagênico, antiulcerogênico, antiviral, antisséptico e antibacteriano [15]. O óleo essencial obtido de *E. caryophyllus* à vista do seu potencial de uso como medicinal vem sendo utilizado em pesquisas em todo o mundo. Entre seus constituintes químicos, destaca-se o composto isolado eugenol como efetivo no controle de fungos [16].

Diante destas considerações, o objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade biofúngica *in vitro* do óleo essencial de *E. caryophyllus*, em diferentes concentrações, sobre o crescimento de *C. herbarum*, visando seu uso como agente biofúngica agrícola no controle da doença que ocasiona ou promove a cladosporiose em maracujazeiros, em substituição aos produtos químicos convencionais, mais nocivos aos ecossistemas.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

A amostragem ocorreu em novembro de 2019, no município de Paty do Alferes, localizado na Região Metropolitana do Estado do Rio de Janeiro, Brasil nas coordenadas geográficas a 22° 25' de latitude sul e 43° 25' de longitude oeste, a 610 metros de altitude. O maracujazeiro que apresentou a doença estava sob o sistema convencional de um pomar comercial, em seu segundo ano de cultivo em plena fase vegetativa. As plantas avaliadas apresentavam sintomas típicos de cladosporiose em maracujazeiro e principalmente, a cancrose foi mais presente (Figura 1). A partir de 11 pés com incidência da doença as amostras de folhas, flores e frutos foram coletadas e

devidamente identificadas, depositadas em sacos de papel kraft e mantidas sob refrigeração até o momento da análise [17] nos laboratórios do Centro Nacional de Pesquisa em Agrobiologia da Embrapa (Embrapa Agrobiologia).

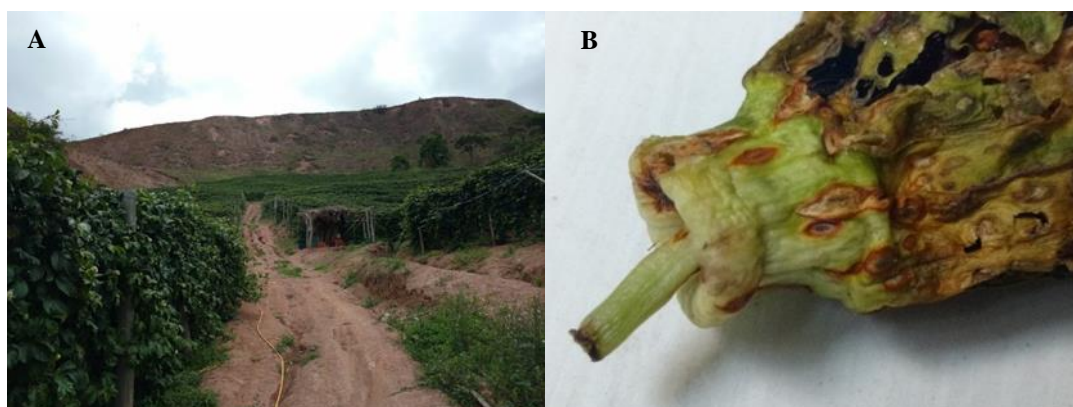


Figura 1: *Passiflora edulis*. A) Cultura do maracujá a campo sob cultivo em espaldeira vertical; B) Botão floral com sintomas característicos de cancrose em maracujazeiro.

Quanto ao isolamento do agente causal foi pelo método direto [18]. O fungo foi isolado em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) a partir das lesões no botão floral e frutos de maracujazeiro, tratados previamente com solução de hipoclorito de sódio a 1% por 1 minuto, seguida de três lavagens em água destilada autoclavada.

O óleo essencial de *E. caryophyllus* utilizado nos ensaios é da marca comercial Ferquima. De acordo com o laudo técnico fornecido pelo fabricante, o método de extração empregado para a sua obtenção foi o arraste à vapor, realizado a partir dos botões florais.

No presente estudo, o óleo essencial de *E. caryophyllus* foi analisado por cromatografia gasosa acoplada à espectrômetro de massas (CG-EM Shimadzu, QP 5050, coluna capilar DB-5 – 30 m x 0.25mm de diâmetro interno x 0.25µm de espessura), na programação de 60 °C – 240 °C (3 °C/min). Utilizou-se o hélio como gás carreador com uma taxa de fluxo de entrada a 3 mL.min<sup>-1</sup> e de fluxo total de 46,2 mL.min<sup>-1</sup>. As temperaturas do injetor e do detector foram 240 e 230 °C, respectivamente. A identificação dos constituintes químicos do óleo essencial foi realizada por comparação de seus espectros de massa e valores de índice de Kovats (IK) com compostos conhecidos descritos na literatura [19].

As análises foram realizadas em delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial com oito (8) tratamentos, cinco (5) repetições, com os controles positivo e negativo. No programa estatístico Bioestat 5.0, os dados foram submetidos à análise de variância à 5% de probabilidade (ANOVA).

Os bioensaios realizados para avaliação do crescimento micelial *in vitro*, ocorreram de forma quantitativa, no qual o óleo essencial testado sofreu diluição em série, solubilizado em dimetilsulfóxido (DMSO) e tween 20 a 0,8%. A sensibilidade do organismo foi testada a um gradiente definido de concentrações do óleo essencial: 320; 160; 80; 40; 20; 10; 5; 2,5 e 1,25 µL.mL<sup>-1</sup> e controles positivo e negativo. Desta forma, foi possível conhecer, a concentração mínima inibitória e a concentração máxima que ainda se situa na região linear da curva de resposta [20].

Nos ensaios para avaliação da bioatividade foi utilizado o meio de cultura BDA, preparado conforme o fabricante e vertido em placas de Petri de 9 cm de diâmetro, usando-se 5 placas para cada tratamento. Foi dispensado na superfície do meio de cultura BDA alíquotas de 40 µL de emulsões do óleo essencial de *E. caryophyllus*, no qual os tratamentos consistiram em 12,8; 6,4; 3,2; 1,6; 0,8; 0,4 e 0,2 µL por superfície. A seguir, foi realizado o espalhamento com o auxílio de alça de Drigalski, permanecendo as placas de Petri por um período de 1 hora em câmara de fluxo laminar, para a secagem das mesmas.

O desenvolvimento micelial do fungo a ser testado ocorreu em meio de cultura BDA, durante um período de 15 dias. Com o auxílio de uma alça de metal, flambada, em condições assépticas,

um disco de BDA com o micélio de 5 mm de diâmetro, obtido do bordo da colônia do patógeno com furador de metal foi depositado no centro de cada placa de Petri nos diferentes tratamentos. Em seguida, as placas foram imediatamente embaladas em papel filme e transferidas para uma câmara incubadora BOD (Biochemical Oxygen Demand), no escuro, a uma temperatura de 27 °C. Para o controle positivo, foi utilizado o fungicida tiofanato metílico a 1.000 ppm e como controle negativo (branco), foi utilizado o solvente DMSO e Tween 20 a 0,8%, com 5 repetições cada.

As placas foram examinadas a partir do 3º dia de incubação para verificar a presença ou não da inibição do crescimento fúngico e para fazer as aferições dos diâmetros de crescimento. O diâmetro médio de crescimento da colônia foi determinado por meio de um paquímetro digital de 0 a 150 mm de capacidade. As mensurações do diâmetro micelial foram verificadas em dois sentidos diametralmente opostos e calculada a taxa de inibição do crescimento micelial (ICM) para cada tratamento, com base nos diâmetros de crescimento fúngico da testemunha em relação ao crescimento do tratamento, medidos ao 6º dia de incubação, expressa pela fórmula:

$$ICM (\%) = \frac{(C_{trat})}{C_t} \times 100$$

Onde:

ICM (%) = taxa de inibição do crescimento micelial

$C_{trat}$  = diâmetro médio de crescimento do microrganismo no tratamento

$C_t$  = diâmetro médio de crescimento do microrganismo testemunha

A taxa de crescimento micelial ( $T_xCM$ ) foi medida a partir de mensurações dos diâmetros de crescimento fúngico com 3 e 6 dias de incubação, em relação à testemunha. A  $T_xCM$  foi calculada pela fórmula:

$$T_xCM = \left( \frac{D_F}{D_T} \right)$$

Onde:

$T_xCM$  = taxa de crescimento micelial

$D_F$  = diâmetro final da colônia (mm)

$D_T$  = diâmetro da testemunha (mm)

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os resultados das análises cromatográficas (Tabela 1) do óleo essencial de cravo-botão, o constituinte majoritário é o eugenol, seguido pelo cariofileno e acetato de eugenol.

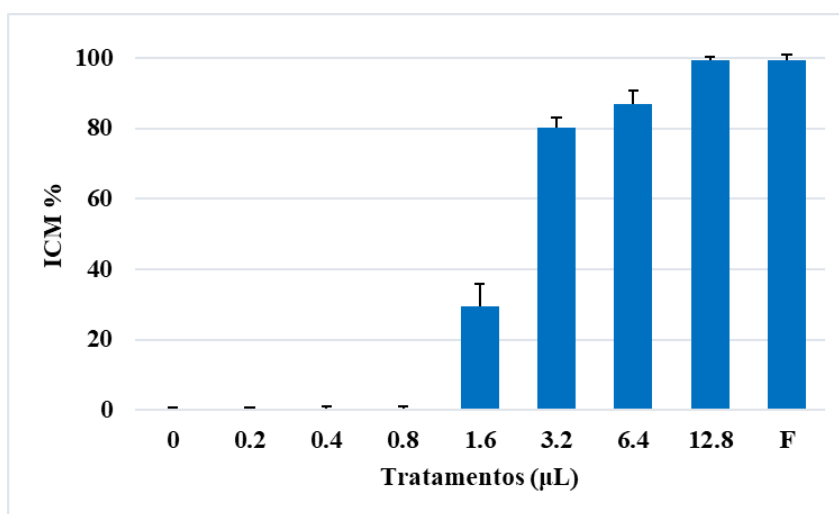
Tabela 1. Principais constituintes químicos identificados no óleo essencial de cravo-botão.

Constituintes químicos	IR <sup>1</sup>	Área%
Eugenol	1359	62,42
Cariofileno	1404	19,95
Acetato de eugenol	1530	14,86
a-Humeleno	1552	2,87
Óxido de cariofileno	1581	0,54
d-Cadineno	1522	0,15
(E,E)-a-Farneseno	1509	0,10
g-Muroleno	1479	0,11

<sup>1</sup>Índice de retenção

Os resultados dos bioensaios demonstraram a inibição gradativa do crescimento micelial de *C. herbarum* em função de doses crescentes do óleo essencial de *E. caryophyllus*. O ensaio revelou um efeito potencial antifúngico com a ICM observada nas concentrações que variam entre 1,6 a 12,8  $\mu\text{L}$  (Figura 2A), onde o fungo mostrou-se sensível aos tratamentos. Na dosagem de 3,2  $\mu\text{L}$  houve uma ICM de 80%, obtendo-se inibição total a partir da dose de 12,8  $\mu\text{L}$ . Já as doses entre 0 a 0,8  $\mu\text{L}$  não inibiram o crescimento micelial de *C. herbarum*, a ICM foi igual a zero. Quanto à  $T_x\text{CM}$  medida aos 3 e 6 dias de incubação (Figura 2B), na dose de 0,8  $\mu\text{L}$  inicialmente, o crescimento foi de apenas 50%, porém no 6º dia a  $T_x\text{CM}$  calculada foi equivalente à testemunha não tratada com o óleo essencial. As  $T_x\text{CM}$  ao longo do tempo foram superiores, principalmente neste tratamento, recuperando dessa forma, o crescimento inicialmente retardado na primeira avaliação (ao 3º dia). Na dose de 1,6  $\mu\text{L}$  a  $T_x\text{CM}$  foi bastante reduzida, principalmente no 3º dia. Mesmo no 6º dia de crescimento, nas doses a partir de 6,4  $\mu\text{L}$ , a  $T_x\text{CM}$  não chegou a 0,2 e na concentração de 12,8  $\mu\text{L}$  a  $T_x\text{CM}$  foi igual a zero, demonstrando sua atividade biofúngicida para *C. herbarum*.

(A)



(B)

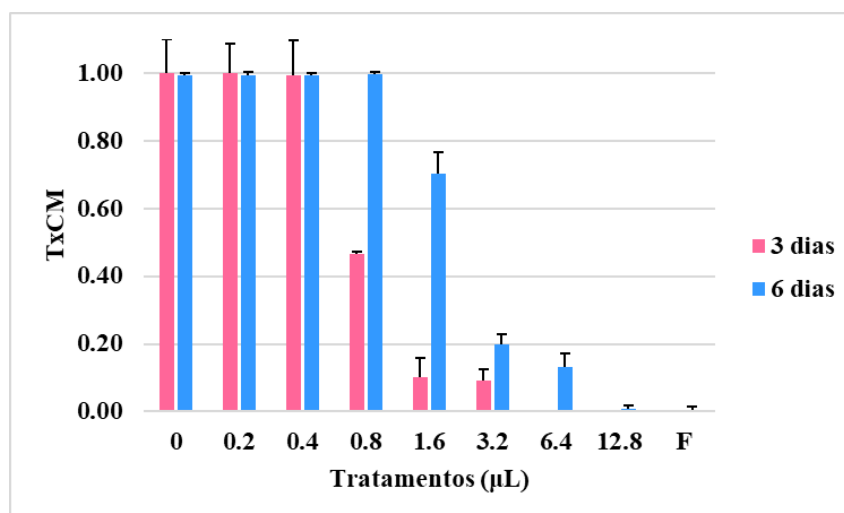


Figura 2: Detecção de atividade antimicrobiana. A: Inibição do crescimento micelial (ICM) de *Cladosporium herbarum* pelo tratamento com óleo essencial de *Eugenia caryophyllus* em diferentes doses. B: Taxa de crescimento micelial ( $T_x\text{CM}$ ) de *C. herbarum* ao 3º e 6º dia de incubação, tratado com óleo essencial de *E. caryophyllus* em diferentes doses.

Na literatura, diferentes estudos comprovam a ação fungicida de *E. caryophyllus* tanto sobre fungos que causam doenças de importância em saúde pública, quanto em fungos fitopatogênicos. Núñez et al. (2001) [21] avaliou o efeito da atividade antifúngica do óleo essencial de cravo disperso em solução concentrada de açúcar 0,2 a 0,8% (v/v) sobre os microrganismos: *Candida albicans*, *Penicillium citrinum*, *Aspergillus niger* e *Trichophyton mentagrophytes*. A melhor atividade fungicida ocorreu a 37 °C, onde um minuto de contato foi suficiente para matar uma população de  $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup> de *Candida albicans*. Para *P. citrinum*, *A. niger* e *T. mentagrophytes*, uma ação letal importante foi observada: o óleo essencial de cravo (0,4% v.v.) em solução concentrada de açúcar por 1 hora reduziu em 99,6% um inóculo de  $10^6$  u.f.c.mL<sup>-1</sup> de *T. mentagrophytes*. O efeito letal do óleo essencial de cravo sobre *C. albicans*, após 2 minutos de contato, foi semelhante ao de desinfetantes comumente utilizados em hospitais, como povidona-iodo e cloroxilenol. Segundo Jain e Sharma (2019) [22] uma propriedade fungicida potente foi revelada durante a avaliação antifúngica do óleo de *E. caryophyllus* nas concentrações de 25 a 100 % aplicado de forma tópica contra fungos (causadores de micoses em seres humanos). Todas as concentrações apresentaram-se como excelentes inibidores em comparação com os antifúngicos padrões, como griseofulvina, cetoconazol e itraconazol.

A atividade antimicrobiana do óleo essencial de *E. caryophyllus* pode ser explicada devido à presença de eugenol (62,42%), componente em maior percentual na sua composição química, amplamente utilizado nas áreas médica e alimentícia, conhecido por sua atividade antifúngica contra diversos microrganismos. Inclusive uma ação sinérgica do cravo combinado com eugenol foi demonstrada. Castro et al. (2017) [16] avaliou a ação direta do óleo essencial de cravo e o composto isolado, eugenol e da interação entre estes contra o fungo *Alternaria alternata*. Os ensaios indicaram que o óleo essencial de cravo e o eugenol reduziram significativamente o crescimento fúngico, destacando o composto isolado eugenol como efetivo no controle do fungo *A. alternata*. A atividade antifúngica de *E. caryophyllus* sobre *A. alternata*, fungo que causa doença de pós-colheita em pitaia (*Hylocereus undatus* Haw.) foi revelada em um ensaio *in vivo*, no qual frutos de pitaia tratados com *E. caryophyllus* nas concentrações de 500 e 1000 µg.mL<sup>-1</sup> exibiram uma redução de 31% no crescimento micelial em comparação ao controle. O composto eugenol também se destacou no controle da mancha foliar em macieira, causada por *Colletotrichum fructicola* [23].

O constituinte químico acetato de eugenol presente no óleo essencial de cravo-botão utilizado neste estudo, no qual apresenta-se em bom percentual (14,86%) foi relatado como antifúngico eficaz no tratamento de sementes. Silva et al. (2018) [24] trataram sementes de ervilha para o controle de *Cladosporium* spp. com acetato de eugenol (0,2%) e extrato de cravo (10%). Em ambos os tratamentos, o efeito antifúngico foi confirmado com total inibição de *Cladosporium* spp. e ademais, não interferiram na germinação. Em contrapartida, a testemunha demonstrou 92% de incidência do fungo. O presente trabalho, não verificou o efeito antifúngico de nenhum componente químico do óleo essencial de cravo-botão, o estudo de cada um desses componentes químicos isoladamente é de grande importância já que o óleo essencial demonstrou potencial de uso no controle de *C. herbarum*.

A cladosporiose em maracujazeiro é uma grave doença de pós-colheita, que ocasiona grandes perdas aos fruticultores. A doença afeta todos os órgãos aéreos da planta, com necroses, mas principalmente reduz a qualidade dos frutos, como o próprio nome já diz ‘verrugose em frutos’, devido às lesões semelhantes a verrugas. Tendo em vista que na fruticultura a qualidade visual é de suma importância para a classificação dos frutos, e conseqüente remuneração, problemas fitossanitários como estes inviabilizam a exportação [25] e impactam negativamente até mesmo a comercialização *in natura* dos frutos no mercado interno, já que a aparência é desagradável [26]. Daí a importância de manejo dessas doenças de pós-colheita e ainda, com o uso de produtos naturais de menor impacto ambiental, bem como à saúde do trabalhador rural e sociedade.

Em suma, os resultados evidenciaram que o óleo essencial de *E. caryophyllus* mostra-se eficaz na inibição do fungo *C. herbarum in vitro* indicando sua atividade biofungicida. No presente estudo, também ficou clara a relação inversa entre ICM e T<sub>x</sub>CM. Estes dados são favoráveis e poderão impulsionar futuras pesquisas sobre as particularidades fitoquímicas, toxicológicas e farmacológicas tanto do óleo essencial de *E. caryophyllus*, bem como de seus constituintes químicos, isoladamente ou em conjunto. À vista disso, mais trabalhos deverão ser realizados, testando-se novas concentrações dos óleos essenciais *in vivo*, avaliando-se a atividade biofungicida,

bem como estabelecer concentrações inibitórias seguras do óleo essencial e parâmetros para o seu uso.

#### 4. CONCLUSÃO

*Eugenia caryophyllus* apresentou potencial biofungicida *in vitro* para o fungo *C. herbarum*, com doses crescentes do óleo essencial. Agiu com eficácia na inibição de 80% do crescimento micelial de *C. herbarum* a partir da dose de 3,2 µL e apresentou forte ação fungicida com 100% de ICM a partir da dose de 12,8 µL. Entretanto, estudos adicionais serão necessários visando identificar o mecanismo de ação deste produto natural sobre o fungo testado, a fim de viabilizar testes *in vivo* na elaboração de produtos fitossanitários naturais sustentáveis que possam ser utilizados em sistemas orgânicos ou agroecológicos de produção agropecuária no controle do agente incitador da cladosporiose em maracujazeiro.

#### 5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio recebido da: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e EMBRAPA Agrobiologia.

#### 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Faleiro FG, Junqueira NTV. Maracujá: o produtor pergunta, a Embrapa responde. Brasília (DF): Embrapa; 2016. 341 p.
2. Ficher IH, Rezende JA. Diseases of passion flower (*Passiflora* spp.). Pest Technol 2008 Abr;2(1):1-19.
3. Barreto RW, Requia AC, Casa RT. Queima de mudas do maracujazeiro *Passiflora edulis* causada por *Cladosporium cladosporioides*. Fitopatol Bras. 1996;21:348.
4. Sussel AAB. Estudo da epidemiologia da verrugose-do-maracujazeiro. Planaltina (DF): Embrapa Cerrados; 2015. 33 p.
5. Viana FMP, Freire FCO, Cardoso JE, Vidal JC. Principais doenças do maracujazeiro na Região Nordeste e seu controle. Fortaleza (CE): Embrapa Agroindústria Tropical; 2003. 12 p. (Comunicado técnico 86).
6. Peruch LAM, Colariccio A, Batista DC. Controle de doenças do maracujazeiro: situação atual e perspectivas. Agropecu Catarinense. 2018 Jan/Abr;31(1):37-40, doi:10.22491/RAC.2018.v31n1.2.
7. Singh D, Singh SK, Modi A, Singh PK, Zhimo VY, Kumar A. Impacts of agrochemicals on soil microbiology and food quality. In: Prasad MNV, editor. Agrochemicals detection, treatment and remediation [Internet]. Kidlington (GB), Cambridge (US): Elsevier; c2020. p. 101-116, doi.org/10.1016/B978-0-08-103017-2.00004-0.
8. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução Nº 185, de 18 de outubro de 2017. Dispõe sobre a proibição do ingredientativo Carbofurano em produtos agrotóxicos no país e sobre as medidas transitórias de descontinuação de seu uso nas culturas de banana, café e cana-de-açúcar. Diário Oficial da União. 19 out 2017;201(Seção 1):32.
9. Teyssiere R, Manangama G, Baldi I, Carles C, Brochard P, Bedos C, Delva F. Determinants of non-dietary exposure to agricultural pesticides in populations living close to fields: a systematic review. Sci Total Environ. 2020 Nov;143294, doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143294.
10. Gonçalves C, Mrins AT, Amaral AMB, Nunes MEM, Müller TE, Severo E, Feijó A, Rodrigues CCR, Zanella R, Prestes OD, Clasen B, Loro VL. Ecological impacts of pesticides on *Astyanax jacuhiensis* (Characiformes: Characidae) from the Uruguay river, Brazil. Ecotoxicol Environ Safety. 2020 Dec;205(1):1-8, doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111314.
11. Sharma A, Rajendran S, Srivastava A, Sharma S, Kundu B. Antifungal activities of selected essential oils against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* 1322, with emphasis on *Syzygium aromaticum* essential oil. J Biosci Bioeng. 2017 Mar;123:308-313, doi:10.1016/j.jbiosc.2016.09.011.
12. Gahukar RT. Management of pests and diseases of important tropical/subtropical medicinal and aromatic plants: A review. JARMAP. 2018 Mar;9:1-18, doi:10.1016/j.jarmap.2018.03.002.
13. Moutassem D, Belabid L, Bellik Y, Ziouche S, Baali F. Efficacy of essential oils of various aromatic plants in the biocontrol of *Fusarium* wilt and inducing systemic resistance in chickpea seedlings. Plant Protect Sci. 2019 Mar;55(3):202-217, doi:10.17221/134/2018-PPS.

14. Yang L, Wen K S, Ruan X, Zhao Y X, Wei F, Wang Q. Response of plant secondary metabolites to environmental factors. *Molecules*. 2018 Mar; 27;23(4):762, doi:10.3390/molecules23040762.
15. Singh J, Baghotia A, Goel. *Eugenia caryophyllata* Thunberg (Family Myrtaceae): A review. *Int J Res Pharm Biomed Sci*. 2012 Dec;3(4):1469-1475.
16. Castro JC, Endo EH, Souza MR, Zanqueta EB, Polonio JC, Pamphile JA, Ueda-Nakamura T, Nakamura CV, Dias BP Filho, de Abreu BA Filho. Bioactivity of essential oils in the control of *Alternaria alternata* in dragon fruit (*Hylocereus undatus* Haw.). *Ind Crop Prod*. 2017 Mar;97:101-109, doi:10.1016/j.indcrop.2016.12.007.
17. Chaves GM, Carvalho MG, Cruz J Filho, Romeiro, RS. Roteiro de aulas práticas de fitopatologia. Viçosa (MG): UFV; 1953. 58 p.
18. Alfenas AC, Mafia RG. Métodos em fitopatologia. Viçosa (MG): UFV; 2007. 382 p.
19. Adams RP. Identification of essential oils components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy. Carol Stream, Illinois (US): Allured Publishing Corporation; 2007. 804 p.
20. Romeiro RS. Métodos em bacteriologia de plantas. Viçosa (MG): UFV; 2001. 279 p.
21. Núñez L, D'Aquino M, Chirife J. Antifungal properties of clove oil (*Eugenia caryophyllata*) in sugar solution. *Braz J Microbiol*. 2001 Jun;32:123-126, doi:10.1590/S1517-83822001000200010.
22. Jain N, Sharma M. Topical application of *Eugenia caryophyllus* oil against ringworm infection of human beings. *Asian J Pharm Clin Res*. 2019 Jul;12(7):153-157, doi:10.22159/ajpcr.2019.v12i7.32068.
23. Schorr RR. Estudos visando o desenvolvimento de novo fungicida como alternativa de controle de fitopatógenos da maçã baseada em substâncias de baixa toxicidade [dissertação]. Curitiba (PR): Universidade Federal do Paraná; 2018. 93 p.
24. Silva VVS, Pereira AMSS, Oliveira LA, Furtado TL, Souza A. Efeito de óleos essenciais e extratos vegetais no controle de fungos e germinação de sementes de ervilha [Internet]. In: Anais do 5º Simpósio de Iniciação Científica. São Paulo (SP): Faculdade Cantareira; 2018. p. 1-4.
25. Riascos D, Quiroga I, Gómez R, Hoyos-Carvajal L. *Cladosporium*: Causal agent of scab in purple passion fruit or gulupa (*Passiflora edulis* Sims.). *Agric Sci*. 2012 Mar;3(2):299-305, doi: 10.4236/as.2012.32034.
26. Simmonds JH. Powdery spot and fruit scab of the passion vine. *Queensland Agric J*. 1932;38(2):143-152.