

UNIVERSIDADE DE RIBEIRÃO PRETO
UNIDADE DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

SIBILA VIEIRA DE CARVALHO

ÓLEOS ESSENCIAIS NO CONTROLE DE DOENÇAS FÚNGICAS QUE
OCORREM NAS CULTURAS DE SOJA E CITROS

RIBEIRÃO PRETO
2014

SIBILA VIEIRA DE CARVALHO

ÓLEOS ESSENCIAIS NO CONTROLE DE DOENÇAS FÚNGICAS QUE
OCORREM NAS CULTURAS DE SOJA E CITROS


Dissertação apresentada à Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP), como requisito para obtenção do título de mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Sonia Marli Zingaretti
Co-orientadora: Profa. Dra. Ana Maria Soares Pereira

Ribeirão Preto
2014

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE SIBILA VIEIRA DE CARVALHO, ALUNA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE RIBEIRÃO PRETO – UNAERP.

Aos dezessete dias do mês de dezembro de dois mil e catorze, às nove horas, na sala 11 C, da Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública de Dissertação de Mestrado, sob a presidência da Profa. Dra. Sonia Marli Zingaretti, professora da Universidade de Ribeirão Preto e com a presença do Prof. Dr. Geraldo José da Silva Junior, FUNDECITRUS, e da Profa. Dra. Bianca Waléria Bertoni, professora da Universidade de Ribeirão Preto, para distribuição dos trabalhos. Seguidamente, em sessão pública, deu-se início aos trabalhos da Defesa Pública da Dissertação de Mestrado de *Sibila Vieira de Carvalho*, aluna do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Área de Concentração: Biotecnologia Aplicada à Saúde, intitulada: “**Óleos essenciais no combate a doenças fúngicas que atacam importantes culturas agrícolas no Brasil**”, visando à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia. Os examinadores: Prof. Dr. Geraldo José da Silva Junior, Bianca Waléria Bertoni e Sonia Marli Zingaretti arguíram, nesta ordem, a candidata no tempo de até trinta minutos, tendo a candidata respondido a cada examinador no mesmo tempo. Logo após, reuniu-se a Comissão, reservadamente, tendo chegado ao seguinte julgamento, que foi anunciado publicamente: Prof. Dr. Geraldo José da Silva Junior - **aprovada**; Profa. Dra. Bianca Waléria Bertoni - **aprovada** e Profa. Dra. Sonia Marli Zingaretti - **aprovada**. Portanto, a candidata foi **aprovada**, fazendo jus ao título de Mestre em Biotecnologia. Do que, para constar, foi lavrada a presente ata que vai assinada pelos membros da Comissão Examinadora e por Joana Néia Vieira, Secretária da Divisão de Pós-Graduação, que secretariou os trabalhos. Ribeirão Preto, 17 de dezembro de 2014.




Profa. Dra. Sonia Marli Zingaretti
Presidente



Prof. Dr. Geraldo José da Silva junior



Profa. Dra. Bianca Waléria Bertoni



Joana Néia Vieira
Secretária

Aprovada pelo Conselho de Pós-Graduação em Biotecnologia no dia 09/02/2015



Prof. Dra. Suzelei de Castro França
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Homologada pela Comissão Central de Pós-Graduação em ___/___/___

Prof. Dra. Neide Aparecida de Souza Lehfeld
Presidente da Comissão Central de Pós-Graduação

Ficha catalográfica preparada pelo Centro de Processamento
Técnico da Biblioteca Central da UNAERP

- Universidade de Ribeirão Preto -

Carvalho, Sibila Vieira de, 1984-

C331o Óleos essenciais no controle de doenças fúngicas que
ocorrem nas culturas de soja e citros / Sibila Vieira de Carvalho.

- - Ribeirão Preto, 2015.

55f.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Sonia Marli Zingaretti.

A Juliana da Silva Coppede, pela dedicação
que teve com este trabalho

E aos meus pais, Rosa e Gumercindo, por
dedicarem grande parte de suas vidas à
minha realização,

Carinhosamente dedico.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Sonia Marli Zingaretti, por ter me dado a oportunidade de desenvolver este trabalho, pela generosidade com que lidou com minhas dificuldades e meu tempo sempre muito curto e pela segurança transmitida de que estaria sempre ao meu lado, como de fato esteve;

À Prof^a. Dr^a. Ana Maria Soares Pereira, pela rica contribuição que conferiu profundidade a este trabalho e à minha formação;

À Prof^a. Dr^a. Suzelei de Castro França, por todo o suporte;

À Dr^a. Juliana da Silva Coppede, pela dedicação e paciência que teve em me ensinar os testes de microdiluição, pela animada torcida para que tudo desse certo e pela companhia sempre tão especial;

À Prof^a. Dr^a. Silvia Helena Taleb Contini e sua aluna Carolina Duó Bartolomeu, pela preciosa ajuda na identificação dos compostos dos óleos essenciais e pela agradável convivência;

À Prof^a. Dr^a. Bianca Waleria Bertoni, pela ajuda com as análises estatísticas e por ter aceitado o convite para compor a banca examinadora da defesa;

Ao Prof. Dr. Geraldo José da Silva Junior, da Fundecitrus, pelo auxílio com as metodologias para fungos que infectam os citros, pela doação da linhagem de *Colletrotrichum acutatum* utilizada neste trabalho e por ter aceitado o convite para compor a banca examinadora da defesa;

Às Prof^{as}. Dr^{as}. Adriana Aparecida Lopes e Miriam Verginia Lourenço, pelas correções e excelentes contribuições no exame geral de qualificação;

Às técnicas de laboratório Edieidia Souza Pina, Simone Cristina Zampollo Torres, Patrícia Garnica e Sarazete Vaz Pereira, pelo suporte, companhia e compreensão;

A todos os professores e funcionários da Unidade de Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto, principalmente à Rosana Castro França, Tábata, Joana e Patrícia, pelo apoio administrativo;

A todos os colegas da Biotecnologia, sempre queridos, prestativos e companheiros, mesmo em nosso convívio tão raro;

Aos meus pais, Rosa e Gumercindo, pelo amor e pelas forças afetiva e financeira, sem as quais eu não teria dado conta de finalizar esta etapa;

Ao Marcelo, por ser o namorado mais lindo do mundo;

A todos os demais amigos e colegas, pela força e por compreenderem minhas ausências e minha incompletude. Obrigada!

*Quem não sabe nada, não ama nada. [...]
Quanto mais o conhecimento é inerente a
uma coisa, maior o amor... Quem imagina
que todas as frutas amadurecem ao mesmo
tempo que os morangos não conhece nada
de uvas.*

Paracelso

RESUMO

Doenças causadas por fungos geram prejuízos ao produtor e colocam em risco a saúde humana. A forma mais eficiente de controle dessas doenças se dá pela aplicação de defensivos agrícolas tóxicos ao homem e ao meio ambiente. O Brasil destaca-se pela expressiva produção agrícola, mas também pelas doses elevadas de agrotóxicos, cuja aplicação desregrada leva à contaminação ambiental e acarreta em resíduos que persistem nos produtos em que são aplicados, tornando-os impróprios para o comércio interno e a exportação. Além disso, um dos maiores problemas quanto ao uso de produtos sintéticos é a seleção de linhagens de micro-organismos cada vez mais resistentes. Por isso, recentemente, observa-se crescente interesse na busca por novas moléculas de produtos naturais – incluindo os óleos essenciais – com efeito bactericida, fungicida e inseticida, visando o controle desses patógenos. Neste trabalho, avaliou-se a atividade biológica dos óleos essenciais de *Pelargonium graveolens* (Geraniaceae) e de três espécies de *Aloysia* (Verbenaceae) contra os fungos *Phomopsis longicolla*, agente causador da podridão da semente da soja e *Colletotrichum acutatum* – principal agente causador da podridão floral dos citros e da antracnose do morangueiro. Testou-se também a atividade antifúngica dos compostos isolados timol e carvacrol frente aos fitopatógenos, assim como o efeito da interação entre o composto isolado (timol ou carvacrol) e os óleos essenciais de maior ação antifúngica encontrada. De todas as espécies e compostos testados, carvacrol apresentou a maior atividade antifúngica, cujas concentrações inibitórias mínimas foram de 0,019 mg/mL e 0,038 mg/mL contra *P. longicolla* e *C. acutatum*, respectivamente. Este resultado foi significativamente igual ao encontrado para o defensivo agrícola Carbendazim. Os óleos essenciais de *P. graveolens* e *A. polystachya* foram os que apresentaram melhor atividade antifúngica entre os óleos testados. As interações entre o carvacrol e o óleo essencial de *P. graveolens* e *A. polystachya* foram aditivas ou antagônicas, não tendo sido observado efeito sinérgico. De toda forma, os resultados obtidos neste trabalho indicam que carvacrol é uma molécula promissora para o controle das doenças causadas por *P. longicolla* e *C. acutatum*.

Palavras-chave: Carvacrol. Concentração inibitória mínima. Concentração inibitória fracionada. Podridão floral dos citros. Podridão da semente da soja.

ABSTRACT

Diseases caused by fungi lead to agricultural losses and put human health at risk. Chemical fungicides are still the most efficient way to control those diseases, although they are generally toxic to humans and to the environment. Brazilian agricultural production is noteworthy worldwide and so it does its high levels of fungicides and pesticides consumption. These synthetic products, if applied beyond measure can contaminate the environment and persist as residues on the products they are applied on, making them inappropriate for internal market and exportation. Besides that, fungicide resistance has become one of the most important issues in modern agriculture, and the use of synthetic fungicides can lead to the selection of resistant strains. Therefore, it has lately increased the demand for the development of new molecules obtained from natural products – including essential oils – that may have bactericide, fungicide and pesticide properties and could be used in the control of pathogens growth. In this work, we evaluated the biological activity of *Pelargonium graveolens* (Geraniaceae) and three species of *Aloysia* (Verbenaceae) essential oils against *Phomopsis longicolla* – the causal agent of Phomopsis seed decay – and *Colletotrichum acutatum* – that causes both postbloom fruit drop of citrus and strawberry anthracnose. The antifungal activity of isolated thymol and carvacrol and the effect of interaction between the isolated compound (thymol or carvacrol) and the essential oil that showed the highest antifungal action were tested as well. Carvacrol displayed the highest antifungal activity, whose minimum inhibitory concentration was 0,019 mg/mL against *P. longicolla* and 0,038 mg/mL against *C. acutatum*. This result was significantly equal to the one found for the synthetic fungicide Carbendazim. *P. graveolens* and *A. polystachya* essential oils showed the best results compared to all the essential oils tested. The interactions between carvacrol and *P. graveolens* and *A. polystachya* essential oils were classified as additive or antagonistic, never synergistic. At any rate, this work shows that carvacrol is a promising molecule to control the diseases caused by *P. longicolla* and *C. acutatum*.

Keywords: Carvacrol. Minimum inhibitory concentration. Fractional inhibitory concentration. Postbloom fruit drop. Phomopsis seed decay.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
1.1.1	<i>Phomopsis longicolla</i>	13
1.1.2	<i>Colletotrichum acutatum</i>	15
1.1.3	Óleos Essenciais e sua Atividade Antifúngica.....	17
1.1.4	A Família Botânica Verbenaceae e o Gênero <i>Aloysia</i>	19
1.1.4.1	<i>Aloysia polystachya</i>	21
1.1.4.2	<i>Aloysia triphylla</i>	21
1.1.4.3	<i>Aloysia gratissima</i>	22
1.1.4.4	<i>Pelargonium graveolens</i>	23
2	JUSTIFICATIVA	25
3	HIPÓTESE	26
4	OBJETIVOS	27
4.1	OBJETIVO GERAL.....	27
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
5	MATERIAIS E MÉTODOS	28
5.1	CULTIVO DOS FUNGOS.....	28
5.2	ESPÉCIES VEGETAIS.....	28
5.3	EXTRAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS.....	28
5.4	ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS FRENTE AOS FITOPATÓGENOS.....	29
5.5	ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE TIMOL E CARVACROL ISOLADOS, COMBINADOS ENTRE SI, E DE CARVACROL ASSOCIADO AOS ÓLEOS	

ESSENCIAIS DE <i>A. polystachya</i> E <i>P. graveolens</i> FRENTE AOS FITOPATÓGENOS.....	30
5.6 AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE O CARVACROL E OS ÓLEOS ESSENCIAIS.....	31
5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	32
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
6.1 OBTENÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS.....	33
6.2 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS.....	33
6.3 ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS E COMPOSTOS TIMOL E CARVACROL FRENTE AOS FITOPATÓGENOS.....	37
7 CONCLUSÕES.....	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45

1 INTRODUÇÃO

As doenças causadas por fungos têm aumentado em número e intensidade nas últimas duas décadas, causando prejuízos à agricultura e colocando em risco a segurança alimentar. Somente no ano de 2011, estima-se que, nas cinco principais culturas mundiais - arroz, trigo, milho, batata e soja – o volume perdido poderia ter alimentado até 8,5% da população mundial. A causa do aumento da dispersão dessas doenças tem sido atribuída à expansão do comércio globalizado, o que confere ao controle fitossanitário relevância mundial (FISHER et al., 2012).

A forma mais eficiente de manter as culturas agrícolas livres de doenças causadas por fungos é o controle químico, por meio da aplicação periódica e preventiva de fungicidas (BRENT, 2007). Entretanto, uma das consequências mais importantes da agricultura moderna é a ocorrência de resistência de linhagens patogênicas a fungicidas, principalmente os que possuem mesmo modo de ação, como benzimidazóis, fenilamidas e estrobirulinas (DEISING; REIMANN; PASCHOLATI, 2008; SILVA-JUNIOR et al., 2014). O uso indiscriminado desses produtos pode agravar ainda mais o problema, pois, além de acelerar o desenvolvimento de resistência, representa alto risco de contaminação ambiental e humana (RODRIGUES, 2006).

Por essa razão, faz-se necessário avaliar o tempo de aplicação de produtos sintéticos, bem como buscar e testar novos produtos – empregados isoladamente e em misturas, a fim de se aumentar a eficiência do controle e reduzir a probabilidade do micro-organismo se tornar resistente (SILVA-JUNIOR et al., 2014). O problema da resistência a antibióticos e fungicidas é enfrentado também nas indústrias farmacêutica e alimentícia e, visando maior eficiência e menor toxicidade, as pesquisas com antimicrobianos têm buscado interações sinérgicas entre compostos (MELETIADIS et al., 2010; EFRATI et al., 2014).

O controle alternativo também ganha destaque nesse cenário. Os óleos essenciais são conhecidos por suas propriedades antimicrobianas, especialmente aqueles constituídos majoritariamente por compostos fenólicos, como carvacrol, timol, linalol, eugenol e mentol (KUORWELL et al., 2011; ABBASZADEH et al., 2014). Dentre esses, carvacrol e timol têm apresentado bons resultados em testes para constituírem filmes antimicrobianos para embalagens na indústria alimentícia,

além de constarem da lista das substâncias consideradas geralmente seguras pelo Food and Drug Administration (KUORWEL et al., 2011; EFRATI et al., 2014).

Os fungos *Phomopsis longicolla* e *Colletotrichum acutatum* infectam, respectivamente, as culturas de soja e citros, duas das mais importantes na agricultura brasileira. *P. longicolla* é o principal agente causador da Phomopsis-da-semente na soja e *C. acutatum* causa a podridão floral dos citros, além de antracnoses em diversas outras espécies, como no morango e na laranja lima. Para o controle da Phomopsis-da-semente, aplicações de fungicidas nas sementes de soja precisam ser realizadas (SHUXIAN, 2011), o que pode, eventualmente, deixar resíduos tóxicos na soja. Com relação ao controle da podridão floral dos citros, a aplicação preventiva periódica se faz necessária e são utilizados fungicidas dos grupos benzimidazol (como o carbendazim), ftalimida (como o folpet) e triazol (como o difenoconazol) (SILVA-JUNIOR et al., 2014).

De acordo com o Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários – Agrofit – um banco de dados para consulta de agrotóxicos registrados mantidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, o carbendazim consta como produto majoritário para o controle da Phomopsis-da-semente e um dos três produtos registrados para aplicação no controle de *C. acutatum* (BRASIL, s.d.). Entretanto, no início de 2012, o carbendazim foi banido da cultura dos citros no Brasil após lotes de suco de laranja exportados do Brasil para os Estados Unidos terem sido rejeitados por conterem resíduos do agrotóxico (EUA..., 2012).

Esse episódio evidenciou a necessidade de se investir em métodos e produtos alternativos para o controle de doenças que infectam importantes culturas agrícolas. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade biológica de óleos essenciais obtidos de plantas de uso tradicionalmente medicinal frente aos fitopatógenos *C. acutatum* e *P. longicolla*. Para isso, foram realizados ensaios de microdiluição em caldo, a fim de se obterem as concentrações inibitória e fungicida mínimas dos óleos essenciais frente aos fungos selecionados.

Os óleos essenciais foram extraídos de três espécies do gênero *Aloysia* (Verbenaceae) e de *Pelargonium graveolens* (Geraniaceae), óleos de atividade antimicrobiana descrita na literatura para diversos patógenos. Foram realizados também testes com os compostos isolados carvacrol e timol, adquiridos comercialmente, bem como ensaios para avaliar a combinação entre o carvacrol e os óleos essenciais de *A. polystachya* e *P. graveolens*, os quais apresentaram maior

atividade antifúngica. Com os resultados obtidos neste trabalho espera-se colaborar com ulteriores estudos de desenvolvimento de produtos naturais e alternativos no controle a doenças agrícolas.

1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1.1 *Phomopsis longicolla*

Phomopsis longicolla Hobbs é o principal causador da Phomopsis-da-semente (*Glycine max* (L.) Merrill), também chamada de “Phomopsis seed decay” (PSD). Trata-se de uma das principais doenças que afetam a soja, reduzindo a viabilidade das sementes e alterando suas características morfológicas, bem como a composição e qualidade do óleo que se extrai delas. Embora seja mais associado à PSD, *P. longicolla*, juntamente com outros fungos, principalmente variedades de *Diaporthe phaseolorum* (Cook e Ellis) Sacc., podem causar o chamado cancro da haste e a queima da vagem e da haste (SINCLAIR, 1993; VIDIĆ, JASNIĆ e STOJSIN, 1996; CUI et al, 2009).

Historicamente, o gênero *Phomopsis* foi organizado com base em características morfológicas, bioquímicas e fisiológicas, assim como quanto à virulência, patogenicidade e tipos de hospedeiros. No entanto, análises moleculares mais recentes têm apontado para uma revisão taxonômica de *Phomopsis*, englobando seus representantes no gênero *Diaporthe*, o gênero anamórfico de *Phomopsis*. Por isso, muitas espécies de ambos os gêneros têm sido referidas como pertencentes ao complexo *Diaporthe/Phomopsis* (UDAYANGA et al., 2011). Dessa forma, há muitos estudos que se referem aos fungos que infectam a soja como fungos do complexo *Diaporthe/Phomopsis*.

P. longicolla foi descrito pela primeira vez em 1985, obtido a partir de um isolado de soja. Em cultura, foram observadas diferenças morfológicas comparado a *P. sojae* e seu teleomorfo *D. phaseolorum* var. *sojae*, apresentando grande quantidade de estromas portando conidiomas em picnídios mais longos, alfa conídios mais achatados, conidióforos fialídicos e ramificados, além de baixa produção de beta conídios (HOBBS et al., 1985).

A primeira espécie do complexo *Diaporthe/Phomopsis* foi isolada de soja apresentando os sintomas da queima da vagem e da haste e recebeu o nome

de *Phoma* sp., pelos pesquisadores Wolf e Lehman, em 1920, e, em 1922, de *Phomopsis sojae*, por Lehman. Em estudos mais detalhados, Lehman renomeou a espécie por *D. sojae* em 1923, devido a suas características anamórficas e muito semelhantes a *D. phaseolorum*, passando a se referir à fase anamórfica do fungo como a sua “fase *Phomopsis*” (DIVILOV, 2014). Dez anos depois, Wehmeyer (1933) concluiu, por estudos morfológicos, que *D. sojae* se tratava de uma variedade de *D. phaseolorum*, e a espécie passou a se chamar *D. phaseolorum* var. *sojae*.

Por muito tempo, *P. longicolla* foi referenciado como o causador primário da podridão da semente da soja; porém, a variedade de hospedeiros e a dificuldade de se distinguir os fungos que infectam a soja por comparações morfológicas, visto que são muito semelhantes, têm feito dos integrantes do complexo *Diaporthe/Phomopsis* um grupo de taxonomia complicada e objeto de constantes revisões. Zhang et al. (1998), na tentativa de inferir a filogenia de fungos desse complexo, utilizaram análises morfológicas e marcadores moleculares para sete isolados de *P. longicolla*, um isolado de *Diaporthe* e dezenove isolados de três variedades de *D. phaseolorum* (três de *D. phaseolorum* var. *caulivora*; cinco de *D. phaseolorum* var. *meridionalis*; e onze de *D. phaseolorum* var. *sojae*) provenientes de diferentes partes do mundo. Os pesquisadores concluíram que *P. longicolla* tratava-se de uma espécie isolada, ao passo que *D. phaseolorum* var. *caulivora* e *D. phaseolorum* var. *meridionalis* foram confirmadas como variedades distintas de *D. phaseolorum*. Encontraram elevada uniformidade genética entre os isolados de *P. longicolla* de diferentes regiões do mundo, o que atribuíram ao fato da espécie não ter um teleomorfo. Com relação a *D. phaseolorum* var. *sojae*, especularam que poderia ser dividida em outras variedades ou, ainda, referir-se a uma outra espécie, tendo ficado clara uma relação filogenética entre essa variedade e *P. longicolla*.

De fato, as semelhanças entre *P. longicolla* e *D. phaseolorum* var. *sojae* foram revisadas mais recentemente. Gomes et al. (2013) estudaram 243 isolados do gênero *Diaporthe* e, dentre muitas mudanças, propuseram a inclusão de *P. longicolla* e *D. phaseolorum* var. *sojae* dentro da espécie *D. sojae*. Com a retirada do artigo 59 do Código Internacional de Nomenclatura para algas, fungos e plantas, deve-se atribuir um único nome para as formas sexuadas e assexuadas de fungos, prevalecendo o nome mais antigo. No caso dos fungos do complexo *Diaporthe/Phomopsis*, o gênero *Diaporthe* é mais antigo e, logo, de acordo com

Gomes et al. (2013), todos os fungos do gênero *Phomopsis* deverão em breve sofrer alteração no nome.

1.1.2 *Colletotrichum acutatum*

Colletotrichum acutatum J. H. Simmonds é um fitopatógeno que tem amplo espectro de hospedeiros de importância econômica, principalmente o morango e as diversas espécies e variedades de citros. No morango, o fungo causa necroses no fruto fresco e é o principal agente causador da antracnose (PERES et al, 2005). Nos citros, *C. acutatum* pode causar duas doenças: a podridão floral dos citros e a antracnose do limão “Galego”, atingindo, nesta última, apenas a espécie *Citrus aurantifolia* (Christim.) Swingle. Na podridão floral dos citros, o fungo infecta as flores recém-abertas ou o botão floral, causando a queda prematura do fruto ou a completa podridão do botão floral (FEICHTENBERGER et al. 1991; 1994; LIN et al., 2001).

Antes de ser descrita como uma nova espécie, os representantes de *C. acutatum* eram comumente identificados como sendo da espécie *C. gloeosporioides* (Penz.) Penz. e Sacc. in Penz, como teleomorfos de *Glomerella cingulata* (Stonem.) Spauld. e Schrenk (GUERBER; CORRELL, 2001), ou incluídos no gênero *Gloeosporium* (von Arx) (SIMMONDS, 1965).

Nas espécies de *Colletotrichum*, os conídios são produzidos em estruturas denominadas acérvulos ou em ramificações laterais do micélio. Os conídios produzidos nos acérvulos possuem uma matriz de polissacarídeos e proteínas solúveis em água que os envolvem, protegendo-os da dissecação. A germinação dos conídios ocorre somente na presença de água livre ou elevada umidade relativa (>90%). No entanto, acredita-se que os conídios não tenham papel principal na disseminação da doença, pois não resistem por longos períodos. As estruturas de sobrevivência são os apressórios, que se formam nas extremidades do tubo germinativo do conídio ou das hifas do micélio. Na formação do apressório, ocorre a produção de melanina, conferindo-lhe coloração escura e tornando-o infectivo. O apressório adere à superfície do tecido hospedeiro por meio de uma mucilagem hemicelulósica, emitindo hifas de penetração e colonização. Os apressórios podem, ainda, dar origem a outros apressórios em cadeia ou a um tubo

germinativo, com potencialidade para produção de conídios secundários (PERES et al., 2005; MENEZES, 2006).

Os ciclos de vida de *C. acutatum* na antracnose e na podridão floral dos citros envolvem a produção de grandes quantidades de conídios, que são dispersos pela água ou pelo vento. A importância da água na dispersão desses patógenos faz com que essas doenças sejam mais frequentes nas regiões tropicais e subtropicais, sendo agravadas em longos períodos de chuva, quando podem ocorrer de forma repentina e causar perdas de até 100% (TIMMER et al, 1994). De fato, Silva Jr. (2011), em estudo sobre a epidemiologia da podridão floral dos citros, constatou que, no ano de 2009, três dias consecutivos de chuva foram suficientes para causar uma epidemia explosiva em duas áreas experimentais no estado de São Paulo, a qual atingiu cerca de 80% de incidência de plantas com flores sintomáticas. Após 15 dias desse crescimento abrupto, mais 18 horas de precipitação – distribuídas ao longo de cinco dias – os sintomas foram observados em 100% das plantas. Ainda, verificou que a distribuição espacial inicial da podridão floral dos citros nas áreas investigadas foi aleatória, o que indica a ação de outros agentes na dispersão do patógeno além das chuvas e do vento. Alguns pesquisadores sugerem a própria irrigação por aspersão, insetos e equipamentos utilizados no campo como responsáveis pela dispersão das doenças (TIMMER; ZITKO, 1993; TIMMER et al., 1994). Embora pouco se saiba sobre a citologia do processo infeccioso de *C. acutatum*, as interações patógeno-hospedeiro são descritas para a podridão floral dos citros e para a antracnose do morango.

Na podridão floral dos citros, o ciclo de *C. acutatum* compreende uma fase biotrófica, que ocorre nas folhas; e uma necrotrófica, nas flores. Nas folhas maduras, os conídios germinam para formar apressórios e infecções quiescentes. No período de florescimento, o fungo se reproduz nas pétalas das flores, causando lesões marrons ou alaranjadas e produzindo grandes quantidades de conídios nos acérvulos. Sabe-se que as pétalas produzem substâncias capazes de estimular a germinação dos apressórios e presume-se que, nos períodos de alta umidade, pétalas infectadas que caem sobre folhas assintomáticas são capazes de estimular os apressórios a produzirem conídios secundários, o que auxiliaria na propagação da epidemia (PERES et al., 2005).

O controle da podridão floral dos citros no campo é feito no período de floração com a pulverização de fungicidas como carbendazim, folpet e

difenoconazole. No entanto, esses fungicidas nem sempre são satisfatórios. Para o controle da podridão floral dos citros, eles devem ser aplicados no estágio inicial de formação dos botões florais; quando os botões estiverem maduros ou já abertos, o tratamento pode ser ineficaz (GOES et al., 2008).

Na antracnose do morango, o ciclo de *C. acutatum* é considerado apenas necrotrófico, pois o ciclo biotrófico é muito curto. Embora cause maiores perdas no fruto fresco, *C. acutatum* pode lesionar diversos tecidos da planta, principalmente o pecíolo e as flores. Acredita-se que a infecção no campo se dê pelo plantio de transplantes contaminados previamente (PERES et al., 2005).

Para o controle da antracnose do morangueiro, Kososki et al. (2001) avaliaram a atividade *in vitro* e em campo de onze fungicidas sintéticos e concluíram que, mesmo com o tratamento, houve incidência da doença, indicando a necessidade de estratégias alternativas. O morango precisa ser colhido em sua máxima maturação, para que apresente as características desejáveis para o comércio e consumo (HERNÁNDEZ-MUÑOZ et al., 2008). Por essa razão é tão difícil fazer o controle da doença sem que resíduos permaneçam depositados no fruto.

1.1.3 Óleos Essenciais e sua Atividade Antifúngica

Óleos essenciais são compostos voláteis de forte odor, produzidos por plantas como metabólitos secundários e vêm sendo muito explorados devido a suas fragrâncias, propriedades medicinais e atividade antimicrobiana. Constituem-se, basicamente, por cerca de 20 a 60 compostos provenientes de dois grupos de rotas biossintéticas distintas: os terpenos ou terpenóides – majoritariamente – e compostos alifáticos e aromáticos (BAKKALI et al., 2008).

Terpenos ou terpenóides formam uma classe de produtos naturais muito ampla e estruturalmente diversa. São englobados nessa família os compostos que têm como unidade básica moléculas de cinco carbonos, denominadas isopreno. As unidades bioquimicamente ativas de isopreno são o pirofosfato de dimetilalila (DMAPP) e o pirofosfato de isopentenila (IPP). Essas duas moléculas são chamadas de hemiterpenos, pois possuem cinco carbonos (C₅), ou seja, uma única unidade isoprênica e são derivadas de duas rotas biossintéticas: a via do ácido mevalônico (MVA) ou da 1-dioxi-D-xilulose 5-fosfato (DXP). A partir da DMAPP e do IPP, os

terpenos são formados pela ligação de unidades isoprênicas (IPP), ligadas entre si pelo encadeamento cabeça-cauda, reação catalisada pela prenil transferase (DEWICK, 2002).

Os compostos terpênicos são classificados de acordo com a quantidade de condensações de unidades isoprênicas. Os monoterpenos (C_{10}) representam 90% da constituição dos óleos essenciais, embora sesquiterpenos (C_{15}) também sejam bastante comuns. Apesar dos mais variados terpenos apresentarem-se como polímeros de unidades isoprênicas, são raros os terpenos que mantêm uma estrutura linear. A maioria das moléculas de terpenos é modificada por reações de ciclização, o que lhes atribui propriedades funcionais distintas (DEWICK, 2002). Além dos terpenos, os óleos essenciais são constituídos por compostos aromáticos, derivados dos fenilpropanóides (compostos do tipo C_6C_3), porém, em menor proporção (DEWICK, 2002).

Com relação à toxicidade dos óleos essenciais, acredita-se que sua atuação ocorra na despolarização da membrana mitocondrial em células eucarióticas, aumentando sua permeabilidade e levando a célula a morte (VERCESI et al., 1997), embora alterações morfológicas em todas as partes da célula também tenham sido observadas (SOYLU et al., 2006; SANTORO et al., 2007).

A atividade biológica dos óleos essenciais tem sido atribuída, principalmente, à presença de compostos majoritários com grupos fenóis – como carvacrol e timol – e álcoois – como citronelol e geraniol (BAKKALI et al., 2008). No entanto, acredita-se que os compostos majoritários não sejam exclusivamente responsáveis pela atividade biológica que alguns óleos essenciais apresentam. Burt (2004) sugere que os compostos presentes em menores porcentagens têm papel fundamental na atividade biológica dos óleos essenciais, pois atuariam potencializando a ação dos compostos majoritários, em uma interação sinérgica.

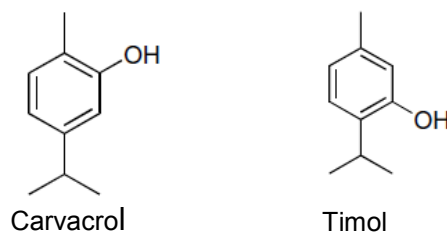
No entanto, um dos principais obstáculos para se trabalhar com óleos essenciais é o fato de que sua composição, qualidade e quantidade podem variar de acordo com o clima, a composição do solo, o órgão da planta em que é sintetizado, a idade e o estágio do ciclo vegetativo da planta (MASOTTI et al., 2003). Além disso, todos aqueles aspectos – composição, qualidade e quantidade do óleo essencial – também variam ao longo do dia na planta (PINA et al., 2012).

Dentre os óleos essenciais de alta atividade antifúngica, carvacrol e timol têm recebido bastante atenção por fazerem parte da lista de aditivos

alimentares classificados como geralmente seguros (GRAS) pela agência norte-americana que regula alimentos e medicamentos – Food and Drug Administration (FDA) (KUORWEL et al., 2011).

Carvacrol e timol são isômeros (Figura 1) e há trabalhos na literatura mostrando diferentes atividades biológicas entre isômeros para um mesmo micro-organismo. Essa diferença de atividade tem sido atribuída à diferente posição do grupo hidroxila nas moléculas (KIM et al., 2008; KUORWELL et al., 2011).

Figura 1 – Estruturas químicas do carvacrol e do timol. A diferença entre as moléculas consiste na posição do grupo hidroxila.



Naturalmente, esses compostos são encontrados principalmente nos óleos essenciais de orégano e tomilho e têm apresentado atividade antimicrobiana *in vitro* contra um amplo espectro de micro-organismos, incluindo bactérias, leveduras e fungos filamentosos. Além disso, têm-se mostrado estáveis quando incorporados em materiais para embalagem de alimentos, atuando como bons conservantes na indústria alimentícia (BASSOLÉ; JULIANI, 2012; EFRATI et al., 2014; KUORWEL et al., 2011; RAMOS et al., 2012).

1.1.4 A Família Botânica Verbenaceae e o Gênero *Aloysia*

A família Verbenaceae reúne cerca de 1000 espécies distribuídas em 34 gêneros (THE PLANT LIST, 2013), compreendendo árvores, arbustos, ervas e lianas, muitas delas aromáticas e de grande importância econômica (SALIMENAPIRES; GIULIETTI, 1998; MARX et al., 2010). Seus representantes são predominantemente originários do Novo Mundo, onde se distribuem do Canadá à Patagônia, principalmente nas regiões subtropicais, apresentando especial diversidade na Argentina. Há também espécimes distribuídos pela Europa, Ásia e norte da África, mas em menor quantidade (MARX et al., 2010).

Verbenaceae, assim como muitos de seus gêneros, têm passado por revisões e reclassificações taxonômicas, tendo algumas de suas tribos e gêneros

sido transferidos para a família Lamiaceae, com a qual mantém estreita semelhança morfológica. Atualmente, Verbenaceae encontra-se subdividida em oito tribos, sendo a maior delas a Lantaneae, que agrupa nove gêneros e 275 espécies – aproximadamente 45% das espécies da família (MARX et al., 2010). Além de ser a maior tribo, é também a mais importante economicamente e a mais estudada, por ser a única tribo de Verbenaceae que reúne as plantas aromáticas, que produzem óleos essenciais (ATKINS, 2004). Dentro de Lantaneae, estima-se que 80% das espécies sejam dos gêneros *Lantana* e *Lippia*. Em terceiro lugar, encontra-se o gênero *Aloysia* Paláu (MARX et al., 2010). De acordo com o portal eletrônico The Plant List (2013), existem 44 nomes de espécies aceitos para o gênero *Aloysia*.

A classificação do gênero *Aloysia* é historicamente confusa, pois há muita semelhança entre as espécies dos gêneros *Lippia* L., *Lantana* L., *Aloysia* e outros gêneros menores, como *Acantholippia* Griseb. Muitos autores incluíram, no passado, algumas espécies de *Lantana*, *Aloysia* e *Acantholippia* no gênero *Lippia*, o qual já chegou a ser considerado como tendo 400 espécies. Moldenke revisou as descrições das espécies nos anos 80 e reclassificou-as. Por esse motivo, muitas espécies de *Aloysia* comumente possuem uma ou mais sinônimas do gênero *Lippia*. Todos os gêneros mencionados têm sido revisados e reorganizados recentemente (PASCUAL et al., 2001), inclusive *Aloysia*.

Uma recente revisão taxonômica do gênero *Aloysia*, baseada em análises moleculares, propõe a inclusão no gênero de *Acantholippia*, o qual tem quatro espécies que possuem características morfológicas tanto de *Aloysia* quanto de *Lippia*. A principal diferença entre esses dois gêneros é a presença de flores com quatro lóbulos nas espécies de *Aloysia*, majoritariamente dispostas em inflorescências do tipo racemo, enquanto que, em *Lippia* sp, os cálices são geralmente bífidos ou truncados, e suas inflorescências são condensadas e capitadas. As espécies de *Acantholippia*, no entanto, apresentavam inflorescências condensadas, como *Lippia*, mas de flores com cálices de quatro lóbulos, assim como as de *Aloysia*. Lu-Irving et al. (2014) resolveram a contradição e passaram a incluir as espécies de *Acantholippia* em *Aloysia*, e a presença de cálices com quatro lóbulos passou a ser considerada uma sinapomorfia do gênero. A classificação dessas espécies é relevante para sua correta identificação, dado o interesse comercial existente nas espécies de Lantaneae.

Embora seja um pequeno gênero dentro da família Verbenaceae, há muitos estudos com relação ao efeito de óleos essenciais e extratos das espécies de *Aloysia* com o intuito de validar suas propriedades medicinais tradicionalmente disseminadas.

1.1.4.1 *Aloysia polystachya*

Aloysia polystachya (Griseb.) Moldenke (sinônimo *Lippia polystachia* Griseb.) é uma espécie consumida na Argentina e Paraguai, popularmente conhecida como “burrito”. A infusão de suas folhas é tradicionalmente ingerida para tratar doenças digestivas e respiratórias (MARTÍNEZ; POCHETTINO, 1992; GONZÁLEZ TORRES, 1996), também sendo relatada contendo propriedades sedativas (DEL VITTO et al., 1997).

Devido ao seu uso tradicional, há estudos com o extrato hidroalcoólico de *A. polystachya* que mostram efeitos antidepressivo e ansiolítico sobre ratos e camundongos (MORA et al., 2005; HELLIÓN-IBARROLA et al., 2006, 2008). Um estudo recente também deu suporte ao uso da infusão das folhas desta espécie por terem observado ação antiespasmódica de seu extrato aquoso e tintura (CONSOLINI et al., 2011).

Quanto à atividade antimicrobiana, o óleo essencial de *A. polystachya* apresentou notável atividade antifúngica em ensaios *in vitro* contra *Tricophyton rubrum*, *Candida albicans* e *Candida krusei* (SARTORATTO et al., 2004; DUARTE et al., 2005; PINA et al., 2012).

O óleo essencial de *A. polystachya* também apresentou, em trabalhos mais recentes, potencial para ser utilizado no controle de pragas como *Nezara viridula*, inseto que ataca plantações de soja (GONZÁLEZ et al., 2010), e *Tribolium confusum* e *Tribolium castaneum*, que infectam grãos estocados em geral (BENZI et al., 2014).

1.1.4.2 *Aloysia triphylla*

Aloysia triphylla (L'Her.) Britton é a espécie tipo do gênero *Aloysia* e possui muitas sinonímias, dentre elas *Aloysia citrodora* Paláu e *Lippia citriodora* (Ort.) H.B.K., popularmente chamada de lúcia-lima ou cedrão.

Esta espécie é cultivada no mundo todo, devido a sua importância comercial (LU-IRVING et al., 2014), que se deve ao interesse por sua essência cítrica, para fazer chás de ervas (ARGYROPOULOU et al., 2007; PARODI et al., 2013). De acordo com Pascual et al. (2001), o uso tradicional de *A. triphylla*, assim como o de muitas espécies de *Lippia* e *Aloysia*, é empregado na forma de infusões para o tratamento de doenças respiratórias, como asma e resfriados; problemas gastrointestinais, como diarreia, indigestão e flatulência; além de distúrbios como insônia e ansiedade.

O óleo essencial de *A. triphylla* é constituído majoritariamente por geranial e neral – dois isômeros de citral -, seguidos por limoneno (SARTORATTO et al., 2004; GOMES et al., 2006; ARGYROPOULOU et al., 2007; KHANI et al., 2012).

Oliva et al. (2011) obtiveram atividade biológica satisfatória do óleo essencial de *A. triphylla* frente a sete espécies de *Candida* resistentes a fluconazol. Sartoratto et al. (2004) também mostraram potencial do óleo essencial de *A. triphylla*, constituído majoritariamente por geranial (21,83%), neral (17,45%) e limoneno (11,03%) no controle de *Candida albicans*, bem como de *Bacillus subtilis* e *Enterococcus faecium*. O extrato da planta também apresentou atividade contra *C. albicans*, bem como contra *Aeromonas* sp, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus vulgaris* (OSKAY et al., 2005; PARODI et al., 2013).

1.1.4.3 *Aloysia gratissima*

Aloysia gratissima (Gillies e Hook) Tronc. é popularmente conhecida como “palo amarillo” ou alfazema do Brasil. Seu uso tradicional envolve o preparo de infusão de suas folhas e flores, para combater incômodos intestinais e doenças respiratórias, bem como para condimentar carnes (PINTO et al., 2007; SANTOS, et al., 2009). Assim como outras espécies de *Aloysia*, possui muitas sinonímias, como *Verbena gratissima* Gill et Hook, *Lippia lycioides* (Cham) Steudel e *Aloysia lycioides* Cham (SANTOS et al., 2011).

O óleo essencial de *A. gratissima* tem composição rica em cetonas e álcoois. Foram encontrados como compostos majoritários pulegona (ZYGADLO et al., 1994); isopinocanfona, seguida de limoneno e guaiaol (TROVATI et al., 2009); β -pineno, *trans*-pinocarveol, *trans*-pinocanfona e *trans*-pinocarveol acetato (SANTOS, et al., 2011) e *E*-cariofileno, germacreno B, guaiaol e bulsenol – nas inflorescências –

e *trans*-pinocanfona, *trans*-pinocarveol acetato e guaiol – nas folhas (SANTOS et al., 2013).

Embora *A. gratissima* seja uma espécie bastante explorada e estudada, há poucos trabalhos na literatura sobre a atividade biológica de seu óleo essencial; dentre esses, nenhum que já tenha mostrado forte atividade antimicrobiana do óleo essencial de *A. gratissima* frente a micro-organismos.

1.1.4.4 *Pelargonium graveolens*

Pelargonium graveolens L'Hér. é uma espécie herbácea popularmente conhecida como gerânio ou malva cheirosa e pertence à família Geraniaceae. O gênero *Pelargonium* é composto por 57 espécies, das quais *P. graveolens* é a mais importante economicamente. Nativa do sudeste da África, a espécie foi introduzida na Europa no século XVII devido ao comércio de especiarias e de coleções de plantas medicinais. Hoje, estima-se que *P. graveolens* seja cultivada no mundo todo devido às propriedades flavorizantes de seu óleo essencial, o qual é amplamente utilizado na indústria de perfumaria, cosméticos e alimentos (LIS-BALCHIN et al., 1997; MILLER, 2002), constando da lista dos óleos essenciais considerados seguros pela Food and Drug Administration (2014).

Os óleos essenciais do gênero *Pelargonium* são genericamente comercializados com o nome de óleos de gerânio e provêm, majoritariamente, da ilha francesa de Réunion, próxima a Madagascar, China, Índia e países do norte da África, como Egito, Marrocos e Argélia (LIS-BALCHIN et al., 1997; BOUKHATEM et al., 2013).

Esses óleos são extraídos principalmente de *P. graveolens*, o que se pode reconhecer, a grosso modo, pela fragrância característica do óleo essencial dessa espécie, muito semelhante à de rosas. No entanto, os óleos são extraídos de diferentes cultivares, o que causa insegurança quanto às suas características químicas, colocando em risco a autenticidade e qualidade deste produto natural. Na tentativa de se criar uma maneira eficaz de identificar a procedência desses óleos, muitos estudos têm sido conduzidos na tentativa de traçar o quimiotipo das diferentes espécies de *Pelargonium*, bem como dos cultivares de *P. graveolens*. Todavia, a grande diversidade química desses óleos continua sendo um desafio à

certificação de qualidade dos óleos essenciais de *P. graveolens* (WANG et al., 2014).

Os compostos majoritários dos óleos essenciais de *Pelargonium* são álcoois monoterpênicos, como geraniol, citronelol e linalol. No entanto, outros componentes podem ser encontrados em porcentagens relativamente altas, como β -citronelol, 10-epi- γ -eudesmol, germacrona, *iso*-mentona, (*E*)-cariofileno, 6,9-guaiadieno, (*E*)-citronelil tigolato, formiato de citronelila e ácido citronílico (LIS-BALCHIN et al., 1997; ÁVAR; MAKSIMOVIĆ, 2012; NICOLAU et al., 2013; BADAUWY; ABDELGALEIL, 2014).

Alguns estudos têm sugerido a presença dos sesquiterpenos 10-epi- γ -eudesmol e 6,9-guaiadieno como marcadores para a identificação do óleo essencial dos diferentes cultivares e híbridos de *P. graveolens*; no entanto, ainda não foi encontrado um padrão que permita identificar um representante de *P. graveolens* por sua composição química (WANG et al., 2014).

Além do tradicional emprego na aromaterapia e como flavorizante, tem sido demonstrado que o óleo essencial de *P. graveolens* possui diversas propriedades biológicas, como inseticida (ALI et al., NICOLAU et al., 2013), anti-inflamatória (MARUYAMA et al., 2006), espasmolítica (LIS-BALCHIN, 1998) e hipoglicêmica (BOUKHRIS et al., 2012).

A atividade antimicrobiana do óleo de *P. graveolens* também já foi relatada, principalmente frente a bactérias e leveduras que infectam alimentos. Nesses trabalhos, observou-se maior atividade do óleo essencial de *P. graveolens* contra linhagens de *Candida*, do que frente a linhagens de *Staphylococcus*, *Bacillus* e *Salmonella* (BOUKHATEM et al., 2013).

2 JUSTIFICATIVA

Tendo em vista a relevância da agricultura para a economia nacional e a dificuldade de se controlar doenças provocadas por fungos, é inegável a necessidade de se investir em métodos que eliminem ou amenizem os prejuízos por elas causados. Para se garantir a sustentabilidade futura da atividade produtiva será, portanto, necessário que se invista em conhecimento científico e tecnológico que permita desenvolver sistemas de produção inovadores, voltados para o aumento da produtividade dos recursos naturais e serviços ambientais utilizados pelo agronegócio. A elaboração de métodos alternativos aos tradicionais agrotóxicos, que, ao serem utilizados de forma incorreta, podem ser altamente tóxicos, mostra-se uma das maiores prioridades para a biotecnologia agrícola. A viabilidade da produção agrícola não deve incluir apenas o retorno econômico, mas o custo relativo à prevenção dos danos que as práticas de cultivo podem causar ao meio ambiente.

3 HIPÓTESE

A atividade biológica dos óleos essenciais extraídos das folhas de *A. polystachya*, *A. triphylla*, *A. gratissima* e *P. graveolens* frente aos fitopatógenos *C. acutatum* e *P. longicolla* em ensaios *in vitro* poderá torna-los alvos de investigação para o desenvolvimento de defensivos agrícolas que apresentem menores riscos à saúde alimentar e ao meio ambiente.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

- Investigar a atividade antifúngica *in vitro* dos óleos essenciais de *A. polystachya*, *A. triphylla*, *A. gratissima* e *P. graveolens* frente aos fitopatógenos *C. acutatum* e *P. longicolla*, bem como dos compostos carvacrol e timol, isoladamente e em associação com os óleos essenciais

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair o óleo essencial das espécies vegetais escolhidas
- Analisar a composição química dos óleos essenciais obtidos
- Avaliar o efeito fungicida e fungistático dos óleos frente aos fungos *P. longicolla* e *C. acutatum*
- Avaliar a atividade fungicida dos compostos isolados carvacrol e timol contra os dois fitopatógenos alvo deste trabalho
- Testar o efeito da combinação dos óleos essenciais de melhor ação antifúngica com o composto (carvacrol ou timol) que apresentar menor concentração inibitória contra os referidos fungos

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 CULTIVO DOS FUNGOS

O inóculo de *P. longicolla* foi obtido no estoque da Unidade de Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto. A linhagem de *C. acutatum* foi gentilmente cedida pelo Fundo de Defesa da Citricultura – Fundecitrus, localizada no município de Araraquara-SP.

Para os ensaios de atividade biológica dos óleos essenciais, os fungos foram crescidos em placas de Petri contendo meio BDA por 15 dias a 25°C no escuro.

5.2 ESPÉCIES VEGETAIS

Partes aéreas de *A. polystachya*, *A. gratissima*, *A. triphylla* foram coletadas na Unidade de Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto, município de Ribeirão Preto-SP, e no Sítio Irmãs Marie, no município de Jardinópolis-SP, nos meses de fevereiro e março de 2014, entre 9:30 e 10:30 horas. A espécie *P. graveolens* foi coletada apenas na Universidade de Ribeirão Preto, no mesmo período e horário das espécies de *Aloysia*. A identificação taxonômica foi confirmada pela taxonomista Dra. Lucia Rossi, do Herbário do Instituto de Botânica do Estado de São Paulo. As exsicatas foram depositadas no Herbário da Universidade de Ribeirão Preto sob os seguintes vouchers: HPMU - 1312 (*A. polystachya*), HPMU – 1881 (*A. triphylla*), HPMU – 1485 (*A. gratissima*) e HPMU – 1779 (*P. graveolens*).

O material coletado foi mantido em estufa de ar circulante a 45°C, por 72 horas. Após a secagem, as folhas foram separadas dos caules, pesadas e estocados a temperatura ambiente.

5.3 EXTRAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais foram obtidos por hidrodestilação em aparelho Clevenger, por 120 minutos. Para *A. gratissima*, cada processo de extração de óleo essencial foi realizado a partir de 100g de folhas secas. As demais espécies vegetais foram separadas em alíquotas de 50g para a realização da extração.

A análise dos constituintes foi realizada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG/EM) em equipamento Shimadzu QP-5000 utilizando capilar de sílica fundida OV-5 (dimensão de 30m X 0,25mm X 0,25µm, Ohio Valley Specialty Chemical, Inc., Marietta, OH, USA), operado por spray de elétrons (70 eV), a temperaturas de injeção e detecção de 240°C e 230°C, respectivamente, utilizando-se Hélio como gás condutor, na velocidade de 1,0mL/min. Dilui-se 1,0µL de cada óleo essencial em 1,0mL de acetato de etila. O volume da amostra injetado foi de 1,0µL no modo de injeção Split 1:20. A variação de temperatura foi de 60 a 165°C em 3°C/min e de 165 a 240°C em 10°C/min. Os constituintes dos óleos foram identificados por comparação à biblioteca de espectrometria de massas NIST 12.Lib., NIST 62.Lib., Wiley 139.Lib. (ADAMS, 1995).

5.4 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS FRENTE AOS FITOPATÓGENOS

A atividade biológica dos óleos essenciais foi avaliada frente aos fungos *P. longicolla* e *C. acutatum* pelo teste de microdiluição em caldo, para se estabelecer a concentração inibitória mínima (CIM), de acordo com o Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), protocolo M38-A2 e conforme realizado por TABANCA et al. (2007). Em placas de 96 poços, foram colocados 100µL de meio RPMI 1640 com L-glutamina sem bicarbonato de sódio (Sigma Chemical Co.®), tamponado a pH 7,0 com 0,165M de MOPS (Sigma Chemical Co.®) e acrescido de Tween em solução a 10%. Na coluna 1 das placas, foram colocados os óleos essenciais das espécies de *Aloysia* na proporção de 1:1 para o volume do meio padrão (acima descrito) e o óleo de *P. graveolens* na proporção de 1:0,5, devido ao escasso volume de óleo disponível. Como fungicida padrão, utilizou-se o defensivo agrícola comercial Carbendazim 500 SC (50% carbendazim, Nortox S.A.), do grupo benzimidazol, a partir da concentração de 1000 ppm.

A seguir, fez-se a microdiluição seriada na razão de 2X nos poços das colunas de 1 a 9. As colunas 10, 11 e 12 foram utilizadas para se fazer, respectivamente, o teste de esterilidade dos óleos essenciais e dos defensivos

agrícolas, do meio de cultura utilizado no ensaio e o controle de crescimento dos fitopatógenos.

Para a preparação do inóculo, os micro-organismos foram crescidos durante 15 dias, conforme descrito no item 5.3. Com o auxílio de uma haste em T estéril, fez-se a raspagem superficial das colônias dos fungos acrescentando-se o meio padrão (RPMI tamponado com MOPS). Essa suspensão foi filtrada em lã de vidro e gaze, e sua densidade óptica foi lida e ajustada para um valor entre 0,125 e 0,150 em espectrofotômetro Spectronic® Genesys 2, com comprimento de onda de 530nm. Em seguida, a suspensão foi diluída 1:50 no meio padrão, o que corresponde a 2X a densidade necessária da ordem de 10^4 conídios/mL. Esta concentração foi confirmada pela contagem de conídios em Câmara de Neubauer.

Aos poços das colunas de 1 a 9 e coluna 12 foram adicionados 100µL da suspensão de conídios. Os testes foram realizados em triplicata. As placas foram mantidas a 25°C e fez-se a anotação da concentração inibitória mínima após 48 e 96 horas. A concentração fungicida mínima foi encontrada replicando-se uma alíquota de cada poço em placas de Petri de 150 mm contendo meio sólido BDA. As placas de Petri foram mantidas a 25°C. Fez-se a leitura do resultado após 48 e 96 horas.

5.5 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE TIMOL E CARVACROL ISOLADOS, COMBINADOS ENTRE SI, E DE CARVACROL ASSOCIADO AOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *P. graveolens* E *A. polystachya* FRENTE AOS FITOPATÓGENOS

Para se obter a concentração inibitória mínima dos compostos isolados timol (Thymol, Riedel-de Haën) e carvacrol (Carvacrol 98%, Aldrich), bem como da associação entre ambos, seguiu-se o mesmo protocolo descrito no item 5.4. A diluição seriada foi feita a partir de soluções contendo timol e carvacrol na concentração de 2,5 mg/mL em solução aquosa de Tween a 10%. As soluções estoques de timol foram preparadas dissolvendo-se o composto em óleo mineral.

Para avaliar a interação entre o carvacrol e os óleos de *P. graveolens* e *A. polystachya* foram estabelecidos três tipos de combinações, às quais atribuímos a nomenclatura de (A), (B) e (C). A primeira delas consistiu na microdiluição seriada de soluções contendo carvacrol e o óleo essencial em concentrações iguais ao dobro das CIM encontradas para cada um deles isoladamente, a qual chamamos de (A).

Nas outras duas combinações, o carvacrol e o óleo essencial foram misturados na proporção de 1:1. Em uma das combinações, carvacrol e óleo essencial foram associados em concentrações iniciais iguais a duas vezes a CIM obtida para o óleo essencial _(B); na outra combinação, carvacrol e óleo essencial foram misturados em uma concentração inicial igual a duas vezes a CIM encontrada para o carvacrol testado isoladamente _(C). Como a CIM obtida para o carvacrol isolado foi significativamente igual para ambos os fungos, consideramos, para o cálculo da sua concentração inicial nas soluções _(A), _(B) e _(C), contra ambos os fitopatógenos, a CIM do carvacrol como sendo 0,038 mg/mL.

Desse modo, para testar o efeito da associação do carvacrol com o óleo essencial de *P. graveolens*, foram preparadas soluções contendo 1,880 mg/mL do óleo essencial e 0,076 mg/mL de carvacrol (PG+C_(A)), outra contendo 0,076 mg/mL de ambos (PG+C_(B)), e uma contendo 1,880 mg/mL do óleo essencial e de carvacrol (PG+C_(C)). Essas três misturas foram ensaiadas contra ambos os fitopatógenos.

O efeito da combinação entre carvacrol e o óleo essencial de *A. polystachya* foi testado contra *P. longicolla* a partir de soluções contendo 0,806 mg/mL do óleo essencial e 0,076 mg/mL do carvacrol (AP+C_(A)); 0,076 mg/mL de carvacrol e óleo essencial (AP+C_(B)); e 0,806 mg/mL de carvacrol e óleo essencial (PG+C_(C)). Contra *C. acutatum*, as concentrações iniciais das soluções ensaiadas foram 1,612 mg/mL de óleo essencial e 0,076 mg/mL de carvacrol (AP+C_(A)); 0,076 mg/mL de carvacrol e óleo essencial (AP+C_(B)); e 1,612 mg/mL de carvacrol e óleo essencial (PG+C_(C)). Para o preparo de todas as soluções ensaiadas na combinação dos óleos essenciais com carvacrol, foram feitas soluções estoques dos óleos essenciais em óleo mineral.

5.6 AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE O CARVACROL E OS ÓLEOS ESSENCIAIS

Os efeitos da combinação dos compostos timol e carvacrol, bem como da associação dos óleos essenciais de *A. polystachya* e *P. graveolens* com carvacrol foram mensurados calculando-se a concentração inibitória fracionária (CIF). A CIF é determinada pela razão entre a CIM do composto na associação e a CIM do composto testado isoladamente. A soma da CIF dos compostos testados em

combinação resulta no índice de concentração inibitória fracionária (ICIF), a partir do qual é possível estabelecer o tipo de interação entre os compostos associados (WHITE et al., 1996). Também se determinaram as CIF e o ICIF para as CFM, utilizando-se a mesma fórmula.

A interação foi classificada como sinérgica quando o valor do ICIF foi $\leq 0,5$; aditiva para valores de $0,5 < \text{ICIF} \leq 2,0$; indiferente ou sem interação quando $2,0 < \text{ICIF} \leq 4,0$; ou antagônica para $\text{ICIF} > 4,0$ (WHITE et al., 1996; MELETIADIS et al., 2014).

5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises foram realizadas em triplicata e o delineamento adotado foi o inteiramente casualizado. Os resultados foram submetidos a ANOVA através do programa SISVAR V.4.3 (FERREIRA, 2003), sendo as médias dos tratamentos comparados pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância (SCOTT-KNOTT, 1974).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 OBTENÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

O volume médio de óleo essencial por 50 g de folhas secas variou de 151 μL , na espécie *P. graveolens*, a 1.062 μL na espécie *A. gratissima*. O mesmo comportamento foi observado para as massas, tendo sido obtida menor massa de óleo essencial de *P. graveolens* e maior massa de óleo de *A. gratissima*. Quanto à densidade, o óleo de *P. graveolens* apresentou o maior valor médio (0,940 $\text{mg}/\mu\text{L}$) e o óleo de menor densidade foi o de *A. triphylla* (0,785 $\text{mg}/\mu\text{L}$). *A. gratissima* foi a espécie que mais produziu óleo essencial, seguida pela *A. polystachya*, *A. triphylla* e *P. graveolens* que produziu um teor de óleo essencial bem inferior comparado ao das demais plantas (Tabela 1).

Tabela 1 – Volume ($V_{\text{óleo}}$), massa ($m_{\text{óleo}}$), densidade ($d_{\text{óleo}}$) e porcentagem ($\%_{\text{média}}$) de óleo essencial obtido de folhas secas das espécies vegetais.

Espécie vegetal	$V_{\text{óleo}}$ (μL)	$m_{\text{óleo}}$ (mg)	$d_{\text{óleo}}$ ($\text{mg}/\mu\text{L}$)	$\%_{\text{média}}$
<i>Aloysia polystachya</i>	646 \pm 52,5	534 \pm 111,0	0,826	1,068
<i>Aloysia triphylla</i>	334 \pm 98,5	338 \pm 106,2	0,785	0,676
<i>Aloysia gratissima</i>	1.062 \pm 162,5	925 \pm 130,7	0,872	1,850
<i>Pelargonium graveolens</i>	151 \pm 8,5	142 \pm 59,5	0,940	0,284

6.2 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Foram identificados aproximadamente 50% dos componentes dos óleos essenciais extraídos de cada uma das espécies, os quais são apresentados nas Tabelas 2-5.

Os compostos majoritários encontrados no óleo essencial de *A. polystachya* foram carvona, na porcentagem de 51,79%; e limoneno, com 21,57% (Tabela 2). O elevado teor de carvona, assim como de outras cetonas, como α -tujona, é característica do óleo essencial de *A. polystachya* (ZYGADLO; GROSSO, 1995; CABANILLAS et al., 2003). Pina et al. (2012) extraíram óleo essencial de folhas da mesma espécie coletadas em diferentes horários, também no município de

Ribeirão Preto-SP e obtiveram os compostos carvona e limoneno como majoritários, nas porcentagens relativas de 80,40% de carvona e 17,07% de limoneno, de plantas coletadas às nove horas da manhã, a porcentagem de óleo obtida no trabalho desenvolvido por estes autores foi 3 vezes maior que o demonstrado no presente estudo e a diferença é explicada em função da época de coleta, pois plantas colhidas na estação seca produz mais óleo essencial. Benzi et al. (2014) também obtiveram carvona e limoneno como majoritários de óleo essencial de *A. polystachya*, nas porcentagens relativas de 83,5% e 16,5%, respectivamente, a partir de folhas frescas coletadas na Argentina, na época do verão.

Tabela 2 - Composição do óleo essencial de *A. polystachya*.

Composto	Porcentagem Relativa	IR	IRC	Fórmula molecular	Massa molecular (g/mol)
Carvona	51,790	1243	1242	C ₁₀ H ₁₄ O	150
Limoneno	21,576	1029	1023	C ₁₀ H ₁₆	136

Nota: IR – índice referência de retenção; IRC – índice de retenção calculado

Com relação ao óleo essencial de *A. triphylla*, os compostos majoritários identificados foram limoneno (22,55%), neral (12,97%), carveol (12,59%), epóxido cedreno (7,97%) e eudesmol (1,83%) e estão apresentados na Tabela 3. O limoneno também foi majoritário quando Özek et al. (1996) extraíram óleo essencial da mesma espécie coletada na Turquia, onde o composto limoneno foi encontrado nas porcentagens entre 14,8 e 18,6%, seguido de geranial (11,9-19,1%), 1,8 cineol (6,8-10,1%), neral (6,0-8,1%), *AR*-curcumeno (4,9-5,7%), óxido de cariofileno (3,1-4,9%) e espatulenol (3,9-4,3%), corroborando em parte com os nossos resultados. No entanto, os dados obtidos no presente trabalho diferem da maioria dos resultados encontrados por outros pesquisadores que trabalharam com a mesma planta em relação a composição dos óleos. Enquanto detectamos limoneno, neral e carveol como majoritários, outros pesquisadores identificaram os isômeros neral e geranial entre os mais produzidos. Carnat et al. (1999) encontraram no óleo essencial extraído de folhas de *A. triphylla* comercializadas no Chile geranial (23,5%), neral (17,6%), limoneno (12,8%), óxido de cariofileno (6,3%), cineol (5,7%), citronelol (5,3%) e espatulenol (4,0%). Figueiredo et al. (2004) extraíram óleo essencial dessa mesma espécie coletada no município de Botucatu-SP e obtiveram

como compostos majoritários geranial (29,54%), neral (27,01%), limoneno (15,93%), geranil acetato (4,00%) e geraniol (3,96%). Khani et al. (2012) coletaram a espécie no Irã e obtiveram como componentes majoritários citral (11,3%), limoneno (10,6%), neral (7,9%), 4-fenil undecano-4-ol (7,7%), α -curcumeno (6,5%), α -cedrol (4,5%) e óxido de cariofileno (4,5%). Segundo Gomes et al. (2006) essa variação na composição é bastante característica no óleo essencial de *A. triphylla*.

Tabela 3 - Composição do óleo essencial de *A. triphylla*.

Composto	Porcentagem relativa	IR	IRC	Fórmula molecular	Massa molecular (g/mol)
Limoneno	22,55	1029	1022	C ₁₀ H ₁₆	136
Neral	12,97	1238	1247	C ₁₀ H ₁₆ O	152
Carveol <trans->	12,59	1216	1218	C ₁₀ H ₁₆ O	152
Epóxido cedreno < α ->	7,97	1575	1570	C ₁₅ H ₂₄ O	220
Eudesmol <10-epi-y>	1,83	1623	1626	C ₁₅ H ₂₆ O	222

Nota: IR – índice de retenção; IRC – índice de retenção calculado.

Na Tabela 4, tem-se os compostos majoritários de *A. gratissima*, quais sejam: sabineno (11,08%), guaiol (9,82%), pinocanfona (7,16%), verbenil acetato (5,10%), cariofileno (4,60%), valerianol (3,67%) e germacreno B (3,40%). Santos et al. (2013) extraíram óleo essencial de folhas e flores frescas separadamente. Para folhas, obtiveram de forma majoritária os seguintes compostos: *trans*pinocarvenil acetato (17,6%), *trans*-pinocanfona (16,3%) e guaiol (11,5%); para as flores, guaiol (19,5%), germacreno B (10,5%), bulnesol (10,0%), *E*-cariofileno (8,9%) e óxido de cariofileno (8,24%).

O óleo essencial obtido em nosso trabalho apresenta composição bastante semelhante ao extraído por Santos et al. (2013), com variação, no entanto, na porcentagem relativa entre os compostos.

Tabela 4 - Composição do óleo essencial de *A. gratissima*.

Composto	Porcentagem relativa	IR	IRC	Fórmula molecular	Massa molecular (g/mol)
Sabineno	11,08	975	971	C ₁₀ H ₁₆	136
Guaiol	9,82	1600	1586	C ₁₅ H ₂₆ O	222
Pinocanfona <trans>	7,16	1139	1140	C ₁₀ H ₁₆ O	152
Verbenil acetato <cis->	5,10	1282	1282	C ₁₂ H ₁₈ O ₂	194
Cariofileno <(E)->	4,60	1419	1416	C ₁₅ H ₂₄	204
Valerianol	3,67	1658	1654	C ₁₅ H ₂₆ O	222
Germacreno B	3,40	1561	1551	C ₁₅ H ₂₄	204
Isoledeno	3,26	1376	1375	C ₁₅ H ₂₄	204
Óxido de pineno <β>	2,56	1159	1153	C ₁₀ H ₁₆ O	152
Pineno <β->	2,48	979	983	C ₁₀ H ₁₆	136

Nota: IR – índice de retenção; IRC – índice de retenção calculado

O óleo de *P. graveolens* obtido neste trabalho apresentou grande diversidade entre seus compostos majoritários e os descritos na literatura. Neste trabalho, estão presentes em maiores porcentagens os compostos nerol (11,12%), 10-epi-γ-eudesmol (11,04%), citronelol (7,38%), guaiadieno (4,03%) e mentona (3,91%), como pode ser observado na Tabela 5. Na literatura, os óleos essenciais extraídos de *P. graveolens* são descritos como fontes de monoterpenos oxigenados, como geraniol, citronelol e linalol (ÁVAR; MAKSIMOVIĆ, 2012). Citronelol e linalol estão presentes no óleo essencial extraído neste trabalho, mas não são os que aparecem em maiores porcentagens. Por outro lado, o composto que aparece como segundo maior em porcentagem – 10-epi-γ-eudesmol – é apontado na literatura como um dos compostos encontrados nos óleos de gerânio, como são popularmente comercializados os óleos essenciais de *Pelargonium* spp., como característico da espécie *P. graveolens* (WANG et al. 2014).

Tabela 5 - Composição do óleo essencial de *P. graveolens*

Composto	Porcentagem	IR	IRC	Fórmula molecular	Massa molecular (g/mol)
Nerol	11,13	1229	1240	C ₁₀ H ₁₈ O	154
Eudesmol <10-epi- y>	11,04	1619	1608	C ₁₅ H ₂₆ O	222
Citronelol	7,38	1225	1215	C ₁₀ H ₂₀ O	156
Guaiadieno	4,03	1444	1438	C ₁₅ H ₂₄	204
Mentona	3,91	1152	1144	C ₁₀ H ₁₈ O	154
Linalol	2,81	1096	1087	C ₁₀ H ₁₈ O	154
Cadinol	2,35	1640	1639	C ₁₅ H ₂₆ O	222
Muuroleno	1,76	1479	1474	C ₁₅ H ₂₆ O	204
Neril propanoato	1,38	1454	1455	C ₁₃ H ₂₂ O ₂	210
Nerolidol <(z)->	1,14	1532	1542	C ₁₅ H ₂₆ O	222
Cadineno <y->	1,10	1513	1516	C ₁₅ H ₂₄	204
Geranil tiglato	0,77	1696	1698	C ₁₅ H ₂₄ O ₂	236
Eudesmol <y->	0,70	1632	1632	C ₁₅ H ₂₆ O	222
Citronelil anguelato	0,55	1657	1648	C ₁₅ H ₂₆ O ₂	238
Cubenol <1,10-di-epi>	0,53	1614	1604	C ₁₅ H ₂₆ O	222
Etil butanoato	0,52	804	814	C ₆ H ₁₂ O ₂	116

Nota: IR – índice de retenção; IRC – índice de retenção calculado

6.3 ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS E COMPOSTOS TIMOL E CARVACROL FRENTE AOS FITOPATÓGENOS

Os resultados obtidos nos testes de microdiluição em caldo estão apresentados nas Tabelas 6 e 7

Tabela 6 – Determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIM) e concentrações fungicidas mínimas (CFM) em mg/mL de carvacrol, timol e óleos essenciais de *Aloysia polystachya*, *Aloysia triphylla*, *Aloysia gratissima* e *Pelargonium graveolens* contra *Phomopsis longicolla*.

Espécies e compostos	CIM	ICIF _{CIM}	Interação entre os compostos	CFM	ICIF _{CFM}	Interação entre os compostos
<i>Aloysia polystachya</i>	0,403 b			0,806 e		
<i>Aloysia triphylla</i>	3,066 e			6,133 l		
<i>Aloysia gratissima</i>	54,560 f			6,812 m		
<i>Pelargonium graveolens</i>	0,940 c			0,940 g		
Carbendazim	0,043 a			0,043 a		
Timol	1,250 d			1,250 i		
Carvacrol	0,019 a			0,076 b		
T+C	0,038+0,038 a	2,030	Sem interação	0,312+0,312 d	4,355	Antagônica
PG + C _(A)	0,940+0,038 c	3,000	Sem interação	0,940+0,038 h	1,500	Aditiva
PG + C _(B)	0,019+0,019 a	1,020	Aditiva	0,038+0,038 b	0,540	Aditiva
PG + C _(C)	0,470+0,470 c	25,237	Antagônica	0,940+0,940 k	13,368	Antagônica
AP + C _(A)	0,403+0,038 b	3,000	Sem interação	0,806+0,038 f	1,500	Aditiva
AP + C _(B)	0,038+0,038 a	2,094	Sem interação	0,076+0,076 c	1,094	Aditiva
AP + C _(C)	0,403+0,403 c	22,210	Antagônica	0,806+0,806 j	11,605	Antagônica

Nota: T+C (timol + carvacrol). PG + C_(A), PG + C_(B) e PG + C_(C) (*Pelargonium graveolens* + carvacrol nas concentrações iniciais, respectivamente, de 1,880 e 0,076 mg/mL (A), 0,076 e 0,076 mg/mL (B), e 1,880 e 1,880 mg/mL (C)); AP + C_(A), AP + C_(B) e AP + C_(C) (*Aloysia polystachya* + carvacrol nas concentrações iniciais, respectivamente, de 0,806 e 0,076 mg/mL (A), 0,076 e 0,076 mg/mL (B) e 0,806 e 0,806 mg/mL (C)). Resultados seguidos da mesma letra em minúsculo são significativamente iguais (Scott Knott, p < 0,05).

Tabela 7 – Determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIM) e concentrações fungicidas mínimas (CFM) em mg/mL de carvacrol, timol e óleos essenciais de *Aloysia polystachya*, *Aloysia triphylla*, *Aloysia gratissima* e *Pelargonium graveolens* contra *Colletotrichum acutatum*.

Espécies e compostos	CIM	ICIF _{CIM}	Interação entre os compostos	CFM	ICIF _{CFM}	Interação entre os compostos
<i>Aloysia polystachya</i>	0,806 b			0,806 c		
<i>Aloysia triphylla</i>	6,133 d			6,133 f		
<i>Aloysia gratissima</i>	109,000 d			6,812 g		
<i>Pelargonium graveolens</i>	0,940 b			0,940 d		
Carbendazim	0,043 a			0,043 a		
Timol	N.D.			N.D.		
Carvacrol	0,038 a			0,156 b		
T+C	0,038+0,038 a	N.D.	N.D.	0,038+0,038 a	N.D.	N.D.
PG + C _(A)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
PG + C _(B)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
PG + C _(C)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
AP + C _(A)	N.D.	N.D.	N.D.	1,612+0,076 e	2,487	Sem interação
AP + C _(B)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
AP + C _(C)	0,806+0,806 c	22,210	Antagônica	0,403+0,403 c	3,083	Sem interação

Nota: N.D. – não determinada nas concentrações ensaiadas. T+C (timol + carvacrol); PG + C_(A), PG + C_(B) e PG + C_(C) (*Pelargonium graveolens* + carvacrol nas concentrações iniciais, respectivamente, de 1,880 e 0,076 mg/mL (A), 0,076 e 0,076 mg/mL (B), e 1,880 e 1,880 mg/mL (C)); AP + C_(A), AP + C_(B) e AP + C_(C) (*Aloysia polystachya* + carvacrol nas concentrações iniciais, respectivamente, de 1,612 e 0,076 mg/mL (A), 0,076 e 0,076 mg/mL (B) e 1,612 e 1,612 mg/mL (C)). Resultados seguidos da mesma letra em minúsculo são significativamente iguais (Scott Knott, p < 0,05).

Os óleos de *A. polystachya* e *P. graveolens* apresentaram a maior atividade fungistática e fungicida contra os fitopatógenos ensaiados. O melhor resultado obtido foi com o óleo essencial de *A. polystachya*, tanto para *P. longicolla* (CIM = 0,403 mg/mL e CFM = 0,806 mg/mL) quanto para *C. acutatum* (CIM e CFM = 0,806 mg/mL). O segundo melhor resultado foi obtido com óleo essencial de *P. graveolens*, que apresentou CIM e CFM de 0,940 mg/mL para ambos os fungos estudados.

Os demais óleos inibiram o crescimento fúngico em concentrações muito elevadas, principalmente o óleo essencial de *A. gratissima*. No entanto, as CFM encontradas para esse óleo foram muito inferiores às CIM, o que não aconteceu com nenhum outro óleo, nem mesmo com os demais compostos isolados testados. Na grande maioria dos ensaios, as CFM encontradas foram iguais ou, no máximo, duas vezes os valores obtidos para as CIM. Com relação ao óleo de *A. gratissima*, as CFM para os dois fitopatógenos foram significativamente inferiores às CIM.

O defensivo agrícola Carbendazim apresentou atividade antifúngica dez vezes maior que a ação do óleo essencial de *A. polystachya* para *P. longicolla* e vinte vezes maior para *C. acutatum* comparado com o óleo da mesma planta. Carvacrol apresentou significativamente o mesmo resultado que o Carbendazim para ambas as espécies de fungos (Tabelas 6 e 7), cujas CIM foram de 0,019 mg/mL frente a *P. longicolla* e 0,038 mg/mL frente a *C. acutatum*. Timol, por outro lado, teve desempenho antifúngico inferior ao carvacrol e ao Carbendazim.

Carvacrol e timol são comumente ensaiados juntos, pois são isômeros e suas atividades costumam ser bastante parecidas, embora possa haver diferença, como foi observado em nosso trabalho. Esses compostos têm sido frequentemente utilizados em testes contra micro-organismos que infectam alimentos, por apresentarem alta atividade antimicrobiana e pertencerem à lista de substâncias GRAS do FDA (KUORWEL et al., 2011; EFRATI et al., 2014).

Em nosso trabalho, carvacrol apresentou maior atividade antifúngica do que timol frente a ambos os fungos ensaiados. No entanto, há trabalhos que mostram que o desempenho desses compostos pode variar conforme o micro-organismo e a dose ensaiada. Carvacrol e timol inibiram completamente o crescimento micelial de *C. acutatum* na concentração de 150 µg/mL; entretanto, em concentrações menores (até 50 µg/mL), timol apresentou melhor desempenho

antifúngico. Já para o fitopatógeno *Botryodiplodia theobromae*, carvacrol e timol tiveram efeitos bastante parecidos (NUMPAQUE et al., 2011). Por outro lado, frente aos fitopatógenos *Phytophthora cactorum* e *Cryphonectria parasitica*, carvacrol apresentou maior atividade antifúngica fumegante, comparado com timol, contra *C. parasitica* quando ensaiado em baixas concentrações (KIM et al., 2008).

Carvacrol também apresentou a melhor atividade dentre timol, eugenol e mentol quando ensaiados contra onze fungos que infectam alimentos (ABBASZADEH et al., 2014). No entanto, a CIM média do carvacrol obtida nesse estudo foi de 154,5 µg/mL, tendo variado entre 50 µg/mL contra *Aspergillus niger* até 350 µg/mL contra *Alternaria alternata*. Timol foi o composto que apresentou o segundo melhor resultado, com uma CIM média de 263,3 µg/mL, tendo variado entre 100 µg/mL, contra *Cladosporium* spp, e 500 µg/mL, contra *Penicillium chrysogenum*. Essa variação mostra que carvacrol e timol apresentam atividade antifúngica seletiva, o que pode ser interessante para o desenvolvimento de um produto.

Em relação às associações frente a *P. longicolla*, não houve efeito sinérgico entre os óleos essenciais de *P. graveolens* e *A. polystachya* e o carvacrol. Entretanto, frente a *P. longicolla*, os resultados obtidos para o antifúngico referência e as combinações T+C, AP+C_(B) e PG+C_(B) foram significativamente iguais, sendo que esta última foi a única associação que apresentou interação aditiva com relação às CIM. Já com relação às CFM, as associações T+C e aquelas contendo óleo essencial e carvacrol na relação de 1:1 em altas concentrações (soluções _(C)) foram antagônicas; as demais combinações foram aditivas.

Contra *C. acutatum*, a atividade da associação T+C foi tão satisfatória quanto à do Carbendazim isolado, tanto para os valores da CIM quanto para as CFM. Porém, não foi possível classificar a interação T+C, pois, nas concentrações ensaiadas para este trabalho, não foram determinadas a CIM nem a CFM do timol isolado, o que impossibilita o cálculo da ICIF da combinação. As demais associações testadas contra esse fungo foram ou antagônicas ou sem interação, sendo que a maioria das CIM e CFM não puderam ser determinadas nas concentrações ensaiadas. Isso significa que a ação dos óleos essenciais de *P. graveolens*, *A. polystachya* e do carvacrol testados isoladamente teve maior atividade fungistática e fungicida do que quando empregados em associação.

No entanto, é preciso ponderar a necessidade de se buscar produtos alternativos para o controle de fitopatógenos que infectam alimentos. Embora o

produto Carbendazim tenha mostrado alta atividade antifúngica, ele é classificado no Ministério da Agricultura como altamente tóxico e muito perigoso ao meio ambiente (BRASIL, s.d.). É notável o crescente número de estudos da atividade biológica de compostos de origem natural frente a micro-organismos, pragas e insetos em geral. Dentre esses compostos, óleos essenciais que apresentam compostos fenólicos têm elevada atividade antimicrobiana, como carvacrol, timol, linalol, eugenol e mentol (KUORWELL et al., 2011; ABBASZADEH et al., 2014)

Com relação às interações entre compostos, há quatro possíveis efeitos descritos na literatura: aditivo, sinérgico, antagônico e indiferente. O efeito aditivo ocorre quando a atividade dos compostos ensaiados corresponde à soma dos resultados obtidos individualmente. O sinergismo é observado quando a associação dos compostos potencializa a atividade de cada um deles isolados, de forma que o efeito da associação é maior do que a soma dos efeitos individuais. Já o efeito antagônico é observado quando a combinação tem atividade menor que um ou ambos os compostos. Por fim, diz-se que o efeito é indiferente quando não há interação entre os compostos (BURT, 2004; BASSOLÉ; JULIANI, 2012).

Óleos essenciais são constituídos por muitas moléculas e o mecanismo de atuação quanto a sua atividade biológica ainda não é totalmente elucidado. Pesquisadores sugerem que compostos majoritários interagem de forma sinérgica com compostos em menores quantidades (BURT, 2004) ou de forma aditiva, haja vista a maioria das moléculas que constituem os óleos essenciais serem muito parecidas (GUTIERREZ; BARRY-RYAN; BOURKE, 2008).

Em nosso trabalho, a combinação entre timol e carvacrol teve menor atividade antifúngica do que o carvacrol testado isoladamente. Lambert et al. (2001) encontraram atividade aditiva na combinação de carvacrol e timol frente a *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Entretanto, Tabanca et al. (2007) não encontraram uma relação direta entre a quantidade de carvacrol no óleo essencial e a atividade antifúngica frente a três espécies de *Colletotrichum*, uma de *Phomopsis* e outra de *Fusarium*, sugerindo que há possível interação sinérgica entre compostos que aparecem em menores porcentagens no óleo essencial, conferindo-lhe boa atividade antimicrobiana.

De fato, Periago et al. (2004) observaram interação sinérgica entre carvacrol, de alta atividade antimicrobiana, e cimeno, de baixa atividade, contra *Listeria monocytogenes*. Burt et al. (2005) obtiveram interação aditiva na associação

de carvacrol e timol frente a *Escherichia coli*. Neste trabalho, foram observadas apenas interações aditivas ou antagônicas entre carvacrol e os óleos essenciais de *A. polystachya* e *P. graveolens* frente a *C. acutatum* e *P. longicolla*.

7 CONCLUSÕES

- Todos os óleos apresentaram efeito antifúngico, embora os óleos essenciais das plantas *Aloysia polystachya* e *Pelargonium graveolens* tenham apresentado maior atividade frente a *Phomopsis longicolla* e *Colletotrichum acutatum*.
- O carvacrol tem potencial antifúngico significativamente igual ao fungicida comercial Carbendazim contra os fitopatógenos ensaiados.
- Ainda que a associação entre o óleo essencial de *Aloysia polystachya* e carvacrol tenha apresentado menor atividade antifúngica quando comparada à atividade do composto isolado, ela pode ser uma excelente alternativa no combate a *Phomopsis longicolla* e *Colletotrichum acutatum*, considerando que o fitocomplexo (associação óleo essencial + composto isolado) dificulta o estabelecimento de resistência pelos micro-organismos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBASZADEH, S. et al. Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi. **Journal de Mycologie Médicale**, Paris, v. 24, n. 02, p. 51-56, 2014.

ADAMS, R.P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. **Allured Publications Corporation**, Carol Stream, 469 p., 1995.

ALI et al. Insecticidal and biting deterrent activity of rose-scented geranium (*Pelargonium* spp.) essential oils and individual compounds against *Stephanitis pyrioides* and *Aedes aegypti*. *Pest Management Science, Malden*, v. 69, n. 12, p. 1385-1392, 2013.

ARGYROPOULOU, C. et al. Chemical composition of the essential oil from leaves of *Lippia citriodora* H.B.K. (Verbenaceae) at two developmental stages. **Biochemical Systematics and Ecology**, Amsterdam, v. 35, n. 12, p. 831-837, 2007.

ATKINS, S. Verbenaceae. *In The families and genera of vascular plants*, Kadereit, J.W. (ed.), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, v. 7, pp. 449-468, 2004.

BADAWY, M.E.I.; ABDELGALEIL, S.A.M. Composition and antimicrobial activity of essential oils isolated from Egyptian plants against plant pathogenic bacteria and fungi. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 52, p. 776-782, 2014.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – a review. **Food and Chemical Toxicology**, Amsterdam, v. 46, p. 446-475, 2008.

BASSOLÉ, I.H.N.; JULIANI, H. R. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. **Molecules**, Basel, v. 17, p. 3989-4006, 2012.

BENZI, V. et al. Composition, repellent, and insecticidal activities of two South American plants against the stored grain pests *Tribolium castaneum* and *Tribolium confusum* (Coleoptera: Tenebrionidae). **ISRN Entomology**, New York, v. 2014, ID 175827, 5p, 2014.

BOUKHATEM, M.N. et al. Essential oil of Algerian rose-scented geranium (*Pelargonium graveolens*): chemical composition and antimicrobial activity against food spoilage pathogens. **Food Control**, Amsterdam, v. 34, p. 208-213, 2013.

BOUKHRIS, M. et al. Hypoglycemic and antioxidante effects of leaf essential oil of *Pelargonium graveolens* L. Hér. In alloxan induced diabetic rats. **Lipids in Health and Disease**, London, v. 11, n. 81, p. 1-10, 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Agrofit: Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. Disponível em <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em 03 dez. 2014.

BRENT, K.J.; HOLLOMON, D.W. **Fungicide resistance**: the assessment of risk. 2 ed. United Kingdom: Aimprint, 2007. (Fungicide Resistance Action Committee).

BURT, S. Essential oils: their antimicrobial properties and potential applications in foods: a review. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 94, n. 03, p. 223-253, 2004.

CABANILLAS, C.M. Essential oil composition of *Aloysia polystachya* (Griseb.) Moldenke under rust disease. **Flavour and Fragrance Journal**, Malden, v. 18, n. 5, p. 446-448, 2003.

CARNAT, A. et al. The aromatic and polyphenolic composition of lemon verbena tea. **Fitoterapia** [S.l.], v. 70, p. 44-49, 1999.

ĆAVAR, S.; MAKSIMOVIĆ, M. Antioxidant activity of essential oil and aqueous extract of *Pelargonium graveolens* L´Hér. **Food Control**, Amsterdam, v. 23, p. 263-267, 2012.

CONSOLINI, A.E. et al. Antiespasmodic effects of *Aloysia polystachya* and *A. gratissima* tinctures and extracts are due to non-competitive inhibition of intestinal contractility induced by acethylcholine and calcium. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, Curitiba, v. 21, n. 5, p. 889-900, 2011.

CUI, Y.L. et al. First report of *Phomopsis longicolla* causing soybean stem blight in China. **Plant Pathology**, Malden, v. 58, p. 779, 2009.

DEISING, H.B. et al. Mechanisms and significance of fungicide resistance. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, n. 39, p. 286-295, 2008.

DEWICK, P.M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 2 ed. Sussex: John Wiley & Sons Ltd, 2002. p. 507.

DEL VITTO, L.A. et al. Recursos herbolarios de San Luis (República Argentina). Primeira parte: plantas nativas. *Multequina*, 6, 49-66 *apud* HELLIÓN-IBARROLA, M.C. et al. The antidepressant-like effects of *Aloysia polystachya* (Griseb.) Moldenke (Verbenaceae) in mice. **Phytomedicine**, Amsterdam, v. 15, p. 478-483, 2008.

DIVILOV, K. Taxonomy and biocontrol of *Diaporthe sojae* and screening for resistance to Phomopsis seed decay caused by an atypical *Diaporthe sojae* isolate using various assays. **Dissertação de Mestrado** (Master of Science in Crop Science), Urbana, 2014, 135 p.

DUARTE, M.C.T. et al. Anti-candida activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdam, v. 97, p. 305-311, 2005.

EFRATI, R. et al. The combined effect of additives and processing on the thermal stability and controlled release of essential oils in antimicrobial films. **Journal of Applied Polymer Science**, Malden, p. 1-10, 2014. doi:10.1002/APP.10564.

EUA alertam sobre agrotóxico em suco de laranja brasileiro. **G1 Economia**, Rio de Janeiro, 12 jan. 2012. Disponível em <<http://g1.globo.com/economia/agronegocios/noticia/2012/01/eua-alertam-sobre-agrotoxico-em-suco-de-laranja-brasileiro.html>>. Acesso em 02 dez. 2014.

FEICHTENBERGER, E. Podridão floral dos citrus: histórico, sintomatologia, etiologia e epidemiologia. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 15, n. 2, p. 109-128, 1991.

FERREIRA, D.F. **SISVAR (sistema para análise de variância de dados balanceados)**, v. 4.3. Lavras: UFLA, 2003.

FIGUEIREDO, R.O. et al. Essential oil composition of *Aloysia triphylla* (L'Hérit) Britton leaves cultivated in Botucatu, São Paulo, Brazil. **Acta Horticulturae**, Leuven, n. 629, 2004.

FISHER, M.C. et al. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. **Nature**, London, n. 484, p. 186-194, 2012.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2014. **Code of Federal Regulations**, Title 21, Volume 3, Part 182 – Substances generally recognized as safe. Disponível em

<<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=182.20>>
Acesso em 12 set. 2014.

GOES, A. et al. Evaluation of fungicide applications to sweet orange at different flowering stages for control of postbloom fruit drop caused by *Colletotrichum acutatum*. **Crop Protection**, Oxford, v. 27, n. 1, p. 71-76, 2008.

GOMES, P.C.S. et al. Production, transformation and essential oils composition of leaves and stems of lemon verbena [*Aloysia triphylla* (L'Herit.) Britton] grown in Portugal. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, n. esp., p. 130-135, 2006.

GOMES, R.R. et al. *Diaporthe*: a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. *Persoonia*, Utrecht, v. 31, p. 1-41, 2013.

GONZÁLEZ, J.O.W. et al. Biological activity of essential oils from *Aloysia polystachya* and *Aloysia citriodora* (Verbenaceae) against the soybean pest *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae). **Natural Product Communications**, Westerville, v. 5, n. 2, p. 301-306, 2010.

GONZÁLEZ TORRES, D.M. Catalogo de plantas medicinales (y alimenticias y útiles) usadas em Paraguay. El País, Asunción, Reimpresión p. 103, 1996 *apud* HELLIÓN-IBARROLA, M.C. et al. The antidepressant-like effects of *Aloysia polystachya* (Griseb.) Moldenke (Verbenaceae) in mice. **Phytomedicine**, Amsterdam, v. 15, p. 478-483, 2008.

GUERBER, J.C.; CORRELL, J.C. Characterization of *Glomerella acutata*, the teleomorph of *Colletotrichum acutatum*. **Mycologia**, v. 93, p. 216-229, 2001.

GUTIERREZ, J. et al. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. **International Journal of Food Microbiology**, New York, v. 124, p. 91-97, 2008.

HELLIÓN-IBARROLA, M.C. et al. The anxiolytic-like effects of *Aloysia polystachya* (Griseb.) Moldenke (Verbenaceae) in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdam, v. 105, p. 400-408, 2006.

_____. The antidepressant-like effects of *Aloysia polystachya* (Griseb.) Moldenke (Verbenaceae) in mice. **Phytomedicine**, Amsterdam, v. 15, p. 478-483, 2008.

HERNÁNDEZ-MUÑOZ, P. et al. Effect of chitosan coating combined with postharvest calcium treatment on strawberry (*Fragaria x ananassa*) quality during refrigerated storage. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 110, n. 2, p. 428-435, 2008.

HOBBS, T.W. et al. A new *Phomopsis* species from soybean. **Mycologia**, Lexington, v. 77, p. 535-544, 1985.

KHANI, A. et al. Chemical composition and insecticide activity of lemon verbena essential oil. **Journal of Crop Protection**, [S.l.], v. 1, n. 4, p. 313-320, 2012.

KIM, J. et al. Fumigant antifungal activity of plant essential oils and components from West Indian bay (*Pimenta racemosa*) and thyme (*Thymus vulgaris*) oils against two phytopathogenic fungi. **Flavour and Fragrance Journal**, Malden, v. 23, p. 272-277, 2008.

KOSOSKI, R.M. et al. Efeito de fungicidas em *Colletotrichum acutatum* e controle da antracnose do morangueiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 3, p. 662-666, 2001.

KUORWEL, K.K. et al. Essential oils and their principal constituents as antimicrobial agents for synthetic packaging films. **Journal of Food Science**, Malden, v. 76, n. 9, p. 164-177, 2011.

LAMBERT, R.J. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, Malden, v. 91, n. 3, p. 453-462, 2001.

LIN, Y. et al. Stigma and style necrosis is associated with postbloom fruit drop disease in citrus following artificial inoculation. **Hortscience**, Alexandria, v. 36, n. 6, p. 1138, 2001.

LIS-BALCHIN, M. et al. The spasmolytic activity of the essential oils of scented *Pelargoniums* (Geraniaceae). **Phytotherapy Research**, Malden, v. 11, n. 8, p. 583-584, 1997.

LU-IRVING, P. et al. Resolving the genera *Aloysia* and *Acantholippia* within tribe Lantaneae (Verbenaceae), using chloroplast and nuclear sequences. **Systematic Botany**, Delaware, v. 39, n. 2, p. 644-655, 2014.

MARUYAMA, N. et al. Suppression of carageenan and collagen II-induced inflammation in mice by geranium oil. **Mediators of Inflammation**, New York, v. 2006, 7 p., 2006.

MARTÍNEZ, M.R.; POCHETTINO, M.L. The “farmacia casera” (household pharmacy): a source of ethnopharmacobotanical information. **Fitoterapia**, [S.l.], v. 63, p. 209-216, 1992.

MARX, H.E. et al. A molecular phylogeny and classification of Verbenaceae. **American Journal of Botany**, Saint Louis, v. 97, n. 10, p. 1647-1663, 2010.

MASOTTI, V. Seasonal and phonological variations of the essential oil from the narrow endemic species of *Artemisia molinieri* and its biological activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 51, n. 24, p. 7115-7121, 2003.

MENEZES, M. Aspectos biológicos e taxonômicos de espécies do gênero *Colletotrichum*. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônoma**, Recife, v. 3, p. 170-179, 2006.

MELETIADIS, J. et al. Defining fractional inhibitory concentration index cutoffs for additive interactions based on self-drugs additive combinations, Monte Carlo simulation analysis, and in vitro-in vivo correlation data for antifungal drugs combinations against *Aspergillus fumigatus*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington DC, v. 54, n. 2, p. 602-609, 2010.

MILLER, D. M. The taxonomy of *Pelargonium* species and cultivars, their origins and growth in the wild. Geranium and Pelargoniums: The Genera *Geranium* and *Pelargonium*, p. 49-79. In Lis-Balchin, M. (Ed.) **Medicinal and Aromatic plants-industrial profiles**. London: Taylor and Francis, 2002.

MORA, S. Anxiolytic and antidepressant-like effects of the hydroalcoholic extract from *Aloysia polystachya* in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behaviour**, Amsterdam, v. 82, p. 373-378, 2005.

NICOLAU, E.S. et al. Atividade inseticida de óleos essenciais de *Pelargonium graveolens* L'Herit e *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown sobre *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). **Química Nova**, São Paulo, v. 36, n. 9, p. 1391-1394, 2013.

NUMPAQUE, M.A. Thymol and carvacrol: biotransformation and antifungal activity against the plant pathogenic fungi *Colletotrichum acutatum* and *Botryodiplodia theobromae*. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 36, n. 1, p. 3-13, 2011.

OLIVA, M.L. et al. Antimycotic effect of the essential oil of *Aloysia triphylla* against *Candida* species obtained from human pathologies. **Natural Products Communications**, Wasterville, v. 6, n. 7, p. 1039-1043, 2011.

OSKAY, M. et al. Antimicrobial activity of the leaves of *Lippia triphylla* (L'Hér.) O. Kuntze (Verbenaceae) against on bacteria and yeasts. **Journal of Biological Sciences**, v. 5, p. 620-622, 2005.

ÖZEK, T. Composition of the essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Herit.) Britton grown in Turkey. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 8, n. 5, p. 581-583, 1996.

PARODI, T.V. et al. Chemical composition and antibacterial activity of *Aloysia triphylla* (L'Hérit) Britton extracts obtained by pressurized CO₂ extraction. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 56, n. 2, p. 283-292, 2013.

PASCUAL, M.E. et al. Lippia: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. *Journal of Ethnopharmacology*, Leiden, v. 76, p. 201-214, 2001.

PERES, N.A. et al. Lifestyles of *Colletotrichum acutatum*. **Plant Disease**, Ames, v. 89, n. 8, p. 784-796, 2005.

PERIAGO, P.M. et al. Use of carvacrol and cymene to control growth and viability of *Listeria monocytogenes* cells and predictions of survivors using frequency distribution functions. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 67, n. 7, p. 1408-1416, 2004.

PINA, E.S. et al. Antimicrobial activity and chemical composition of essential oils from *Aloysia polystachya* (Griseb.) Moldenke grown in Brazil. **Journal of Medicinal Plants Research**, Victoria Island, v. 6, n. 41, p. 5412-5416, 2012.

PINTO, J.E.B.P. et al. Aspectos morfofisiológicos e conteúdo de óleo essencial de plantas de alfazema-do-Brasil em função de níveis de sombreamento. **Revista Brasileira de Horticultura**, Brasília, v. 25, n. 2, p. 210-214, 2007.

RAMOS, M. et al. Characterization and antimicrobial activity studies of polypropylene films with carvacrol and thymol for active packaging. **Journal of Food Engineering**, Amsterdam, v. 109, p. 513-519, 2012.

RODRIGUES, N.R. Agrotóxicos: análises de resíduos e monitoramento. **Construindo a história dos produtos naturais**, Campinas, n. 7, 2006.

SALIMENA-PIRES, F.R.; GIULIETTI, A.M. Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: Verbenaceae. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v. 17, p. 155-186, 1998.

SANTORO, G.F. et al. Effect of oregano (*Origanum vulgare* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oils on *Trypanossoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida) growth and ultrastructure. **Parasitology Research**, [S.l.], v. 100, n. 4, p. 783-790, 2007.

SANTOS, F.M. et al. Produção de mudas de *Aloysia gratissima* (Gilles & Hook) Tronc. por meio da propagação sexuada e assexuada. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Paulínia, v. 11, p. 130-136, 2009.

_____. Characterization of essential oil and effects on growth of *Verbena gratissima* treated with homeopathic phosphorus. **Natural Product Communications**, Westerville, v. 6, p. 1-6, 2011.

_____. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from the leaves and flowers of *Aloysia gratissima*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 15, n. 4, p. 583-588, 2013.

SARTORATTO, A. et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 275-280, 2004.

SCOTT, A.J.; KNOTT, M.A. A cluster analyses method for grouping means in the analyses of variance. **Biometrics**, n. 30, p.507-512, 1974.

SHUXIAN, L. Phomopsis seed decay of soybean. In: SUDARIĆ, A. (Ed.). **Soybean – molecular aspects of breeding**. Croácia: Intech, 2011. p. 277-292. Disponível em <<http://www.intechopen.com/books/soybean-molecular-aspects-of-breeding>>. Acesso em 20.set.2014.

SILVA-JUNIOR, G. J et al. Efficacy and timing of application of fungicides for control of citrus postbloom fruit drop. **Crop Protection**, Oxford, v. 59, p. 51-56, 2014.

SIMMONDS, J.H. A study of the species of *Colletotrichum* causing ripe fruit rots in Queensland. **Journal of Agricultural Sciences**, Toronto, v. 22, p. 437-459, 1965.

SINCLAIR, J.B. Phomopsis seed decay of soybeans – a prototype for studying seed disease. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 77, p. 329-334, 1993.

SOYLU, E.M. Antimicrobial activity of the essential oil of various plants against tomato late blight disease agente *Phytophthora infestans*. **Mycopathologia**, v. 161, p. 119-128.

TABANCA, N. et al. Characterization of volatile constituents of *Scaligeria tripartita* and studies on the antifungal activity against phytopathogenic fungi. **Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical Life Sciences**, Amsterdam, v. 850, p. 221-229, 2007.

_____. Chemical composition and antifungal activity of *Arnica longifolia*, *Aster hesperius* e *Chrysothamnus nauseosus* essential oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 55, n. 21, p. 8430-8435, 2007.

TIMMER, L.W. et al. Postbloom fruit drop of citrus, an increasingly prevalent disease of citrus in the Americas. **Plant Disease**, St. Paul, v. 78, p. 329-334, 1994.

TIMMER, L.W.; ZITKO, S.E. Relationships of environmental factors and inoculum level to the incidence of postbloom fruit drop of citrus. **Plant Disease**, St. Paul, v. 77, p. 501-504, 1993

THE PLANT LIST, 2013. Versão 1.1. Disponível em <<http://www.theplantlist.org/1.1/browse/>>. Acesso em 03 dez. 2014.

TROVATI, G. Essential oil composition of *Aloysia gratissima* from Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 21, n. 4, p. 325-326, 2009.

UDAYANGA, D. et al. The genus *Phomopsis*: biology, applications, species concepts and names of common pathogens. **Fungal Diversity**, v. 50, p. 189-225, 2011.

VERCESI, J.A. et al. The role of reactive oxygen species in mitochondrial permeability transition. **Bioscience Reports**, v. 17, n. 1, p. 43-52, 1997.

VIDIĆ, M. et al. Cultural and morphological characteristic of *Phomopsis sojae* and *Phomopsis longicolla* originating from soybean. *Zastita bilja*, v. 215, p. 37-44, 1996.

WANG, M. et al. Comparison of current chemical and stereochemical tests for the identification and differentiation of *Pelargonium graveolens* (L'Hér.) (Geraniaceae) essential oils: analytical data for (-)-(1S, 4R, 5S)-guaia-6,9-diene and (-)-(7R,10S)-10-epi- γ -eudesmol. **Records of Natural Products**, v. 8, n. 4, p. 360-372, 2014.

WHITE, R.L. et al. Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard and E test. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, n. 8, p. 1914-1918, 1996.

ZHANG, A.W. Molecular identification and phylogenetic grouping of *Diaporthe phaseolorum* and *Phomopsis longicolla* isolates from soybean. **Phytopathology**, St. Paul, v. 88, n. 12, p. 1306-1314, 1998.

ZYGADLO, J.A.; GROSSO, N.R. Comparative study of the antifungal activity of essential oils from aromatic plants growing wild in the central region of Argentina. **Flavour and Fragrance Journal**, Malden, v. 10, p. 113-118, 1995.