

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CURSO DE ENGENHARIA FLORESTAL
CÂMPUS DOIS VIZINHOS

JÉSSICA BATISTA DA MATA

**ÓLEOS ESSENCIAIS COMO ALTERNATIVA DE CONTROLE DE PATÓGENOS
EM SEMENTES DE IPÊ AMARELO (*Handroanthus chrysotrichus* Mart. Ex A.
DC.Mattos)**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

DOIS VIZINHOS
2015

JÉSSICA BATISTA DA MATA

**ÓLEOS ESSENCIAIS COMO ALTERNATIVA DE CONTROLE DE PATÓGENOS
EM SEMENTES DE IPÊ AMARELO (*Handroanthus chrysotrichus* Mart. Ex A.
DC.Mattos)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso II do Curso Superior de Engenharia Florestal da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, como requisito parcial para obtenção do título de Engenheiro Florestal.

Orientador: Dr. Sérgio Miguel Mazaro

Coorientador (a): Karina Guollo

DOIS VIZINHOS

2015

M425o Mata, Jéssica Batista.

Óleos essenciais como alternativa de controle de patógenos em sementes de ipê amarelo (*Handroanthus chrysotrichus* Mart. Ex A. DC. Mattos) / Jéssica Batista Mata – Dois Vizinhos: [s.n], 2015.

32f.

Orientador: Sergio Miguel Mazaro

Co-orientadora: Karina Guollo

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curso de Engenharia Florestal. Dois Vizinhos, 2015.

Bibliografia p.29-32

1.Fitopatologia 2.Fusarium 3.Eucalipto I.Mazaro, Sergio Miguel, orient. II.Guollo, Karina, co-orient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Dois Vizinhos. IV.Título

CDD:634.9

Ficha catalográfica elaborada por Rosana Oliveira da Silva CRB: 9/1745

Biblioteca da UTFPR-Dois Vizinhos



TERMO DE APROVAÇÃO

Título ÓLEOS ESSENCIAIS COMO ALTERNATIVA DE CONTROLE DE PATÓGENOS EM SEMENTES DE IPÊ AMARELO (*Handroanthus chrysotrichus* Mart. Ex A. DC.Mattos)

por

JÉSSICA BATISTA DA MATA

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi apresentado em 26 de junho de 2015 como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Engenharia Florestal. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Prof. Dr. Sergio Miguel Mazaro
Orientador

Prof. Dr. Maristela Rey Borin
Membro titular

Prof. Dr. Flávio Endrigo Cechim
Membro titular

- O Termo de Aprovação assinado encontra-se na Coordenação do Curso -

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela dádiva da vida, por sempre guiar meus passos e permitir que minha fé seja mantida nos momentos mais difíceis.

À minha família, especialmente meu pai José e Belmira, meus irmãos Chris e Theus, aos meus avós e aos cunhados Rodrigo e Nayara, a quem dedico e agradeço por todo amor e carinho recebido, esses que sempre acreditaram e apoiaram minhas escolhas, além da compreensão de suportar os quilômetros de distância.

Agradeço ao saudoso orientador Sérgio Miguel Mazaro por ter me incentivando, acreditado verdadeiramente em meu trabalho e se tornado um grande amigo.

A coorientadora, Karina Guollo, de onde surgiu a base para idealizar o projeto, por sempre me apoiar e ter sido um braço direito em todas as análises.

Agradeço aos amigos de laboratório, em especial ao Nean, Adriano e Mycheli, que muito fizeram para que o trabalho fosse concluído.

Agradeço à Marina e Eloisa que mantiveram nossa amizade de longa data apesar da distância e das muitas vezes que não me fiz presente.

Agradeço a Thay e Thallana, amigas e companheiras de morada que foram uma segunda família nos quase cinco anos de convívio.

Agradeço as amigas de graduação, que foram essenciais durante esses anos de faculdade, nos quais dividindo sonhos, sorrisos, festas, lanches e lágrimas. Em especial a Fabi Lorrane, Dani Bueno e Thati Higa.

RESUMO

MATA, Jéssica Batista. **Óleos essenciais como alternativa de controle de patógenos em sementes de ipê amarelo (*Handroanthus chrysotrichus* Mart. Ex A. DC.Mattos).** 2015. 30f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Florestal) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Dois Vizinhos, 2015.

A utilização de fungicidas no controle de fitopatógenos tem causado alguns problemas relacionados à resistência aos ingredientes ativos, além de sérios danos no meio ambiente e ao homem. Nesse sentido, pesquisas com métodos alternativos de controle de fitopatógenos possuem grande relevância. O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito de óleos essenciais de pitangueira (*Eugenia uniflora*), tomilho (*Thymus vulgaris*), cravo da Índia (*Syzygium aromaticum*) e eucalipto (*Eucalyptus* sp.) no controle de fitopatógenos presentes em sementes de ipê amarelo e de *Fusarium* sp. *in vitro*. Os trabalhos foram desenvolvidos nos laboratórios de fitopatologia e no de sementes da UTFPR durante o ano de 2014. Previamente para a implantação dos experimentos as sementes de ipê amarelo foram coletadas Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Dois Vizinhos e isolou-se *Fusarium* sp. das mesmas. Foram realizados dois experimentos, sendo o primeiro *in vitro*, avaliando o efeito dos óleos sobre o fungo *Fusarium* sp.. Para esses experimentos um disco de 3mm, contendo *Fusarium* sp. foi disposto no centro da placa de petri contendo BDA (Batata Dextrose Ágar), e os óleos essenciais foram aplicados em papel filtro, e esse fixado na tampa superior da placa. As mesmas foram fechadas e acondicionadas em BOD (26°C e fotoperíodo de 12 horas), e avaliou-se por 7 dias o crescimento micelial do patógeno. No segundo experimento, avaliou-se o efeito dos óleos no tratamento de sementes de ipê. As sementes foram tratadas por volatilização com os mesmos óleos do experimento *in vitro*, sendo que para isso as mesmas foram dispostas em lotes de 100 sementes, acondicionadas em embalagens de inox tipo cadinho, e o óleo essencial aplicado em papel filtro (20 microlitros de óleo por papel/cadinho), e então os cadinhos lacrados por um período de 24 horas, sendo que para testemunha foi utilizado água destilada. Após os tratamentos, as sementes foram avaliadas perante o teste de germinação, considerando percentual de plantas germinadas, incidência de patógenos e tamanho de plântulas. Além disso, o material vegetal foi coletado para determinações de análises bioquímicas de proteínas totais, atividade das enzimas fenilalanina amônia-liase, quitinases e β -1-3glucanases. Para os dois experimentos o delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 4 repetições. Os óleos de cravo da Índia, tomilho e eucalipto possuem ação fungicida, enquanto que o de pitangueira possui ação fungistática no controle de *Fusarium* sp. em condições *in vitro*. O óleo de tomilho não causou danos na plântulas, bem como reduziu a incidência de patógenos. Não observou-se efeito dos óleos no processo de indução de resistência nas plântulas.

Palavras-chave: *Fusarium* sp. *Eugenia uniflora*. *Thymus vulgaris*. *Syzygium aromaticum*. *Eucalyptus* sp.

ABSTRACT

MATA, Jéssica Batista. **Essential Oils as Alternative Pathogens Control in Seeds of Ipê-Amarelo (*Handroanthus chrysotrichus* Mart. Ex A. DC.Mattos)**. 2015. 30f. work Course Conclusion (Engineering Forestry Graduation) Federal Technology University - Paraná. Dois Vizinhos, 2015.

The use of fungicides to control plant pathogens has caused some problems related to resistance to active ingredients, in addition to serious damage to the environment and to humans. In this sense, research on alternative methods of plant pathogens control has great relevance. The objective was to evaluate the effect of essential oils of Surinam cherry (*Eugenia uniflora*), thyme (*Thymus vulgaris*), clove (*Syzygium aromaticum*) and eucalyptus (*Eucalyptus* sp) in control of plant pathogens present in seed yellow ipê and *Fusarium* sp. in vitro. The work was developed in plant pathology laboratories and in the UTFPR seeds during 2014. Prior to the implementation of the experiments the seeds of yellow ipê were collected UTFPR – Dois Vizinhos, selected and isolated *Fusarium* sp. thereof. Two experiments were conducted, the first in vitro, evaluating the effect of the oils on the fungus *Fusarium* sp .. For these experience a 3mm disc containing *Fusarium* sp. was disposed in the center of petri dishes containing PDA (Potato Dextrose Agar), essences and oils were applied on filter paper and fixed in this upper cover plate. The samples were sealed and placed in BOD (26°C and photoperiod of 12 hours), and evaluated for 7 days mycelial growth of the pathogen. In the second experiment, we assessed the effect of the oils in the treatment of ipê seeds. The seeds were treated by volatilization with the same oils in vitro experiment, and for that the same were prepared in batches of 100 seeds, placed in a stainless steel crucible containers, and the essential oil applied on filter paper (oil by 20microlitros paper / cup), then the crucibles sealed by a 24-hour period, and for control using distilled water. After the treatments, the seeds were evaluated for germination test, considering the percentage of sprouted plants, incidence of pathogens and size of seedlings. Furthermore, the plant material was collected for determination of biochemical analysis of total proteins, enzyme activity phenylalanine ammonia-lyase, chitinase and β -1-3glucanses. For both experiments the experimental design was completely randomized, with four repetitions. Clove oils from India, thyme and eucalyptus have fungicide, while the Surinam cherry has fungistatic action in the control of *Fusarium* sp. under in vitro conditions. Thyme oil did not cause damage to seedlings, and reduced the incidence of pathogens. No observed effect of the oils on the process of induction of resistance in plants.

Keywords: *Fusarium* sp.. *Eugenia uniflora*. *Thymus vulgaris*. *Syzygium aromaticum*. *Eucalyptus* sp..

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Crescimento Micelial de <i>Fusarium</i> sp. submetido à diferentes tratamentos <i>in vitro</i> . UTFPR – Dois Vizinhos - PR	25
---	----

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Germinação, Incidência de Patógenos e Comprimento de Plântulas em sementes de Ipê amarelo tratadas com óleos essenciais e submetidas ao teste de germinação. UTFPR - Dois Vizinhos – PR. tratamentos em sementes.....28
- Tabela 2:** Análises Bioquímicas de plântulas de ipê amarelo tratadas com óleos essenciais e submetidos ao teste de germinação. UTFPR – Dois Vizinhos - PR28

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1 OBJETIVOS	13
1.1.1 Objetivo Geral	13
1.1.2 Objetivos Específicos	13
2. REFERÊNCIAL TEÓRICO.....	14
2.1 <i>Handroanthus chrysotrichus</i> (Mart. Ex A. DC. Mattos)	14
2.2 PITANGUEIRA (<i>Eugenia uniflora</i> L.)	15
2.3 CRAVO DA ÍNDIA (<i>Syzygium aromaticum</i> (L.) Merr. & Perry)	15
2.4 TOMILHO (<i>Thymus vulgaris</i>).....	16
2.5 EUCALIPTO (<i>Eucalyptus</i> sp.).....	17
2.6 CONTROLE ALTERNATIVO DE PATÓGENOS	18
3. METODOLOGIA	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4.1.1 Crescimento micelial de <i>Fusarium</i> sp.....	25
4.2.1 Tratamento de sementes	26
5. CONCLUSÃO	29
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30

1. INTRODUÇÃO

O *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. Ex A. DC. Mattos) é uma espécie florestal nativa da Mata Atlântica, com maior ocorrência no Brasil do Estado do Espírito Santo até de Santa Catarina, principalmente na encosta mais elevada na floresta pluvial atlântica. A madeira é ideal para obras externas e internas em construção civil. Além disso, a árvore é extremamente ornamental e muito utilizada em arborização urbana. Aconselha-se sempre sua inclusão em plantios mistos e em reflorestamentos de áreas degradadas de preservação permanente (LORENZI, 1998 p. 368).

As sementes de espécies nativas das regiões tropicais são mais suscetíveis ao ataque de patógenos devido às características climáticas dessas regiões e a facilidade dos micro-organismos se desenvolverem em ambientes com alta temperatura e umidade (NASCIMENTO et al., 2005, p.150). São escassas as informações sobre a incidência de patógenos em espécies florestais e pouco se sabe sobre os mecanismos de ação dos mesmos. Contudo, torna-se importante a realização de pesquisas para determinar quais patógenos causam danos às sementes ou às plântulas, seus mecanismos de ação e formas de controlá-los (CARNEIRO, 1986, p.559).

Dentre os microorganismos patogênicos encontrados em sementes de ipê amarelo encontra-se *Fusarium* sp., *Trichoderma* sp., *Alternaria* sp., *Phomopsis* sp., *Epicoccum* sp., *Pestalotia* sp., *Chaetomium* sp e *Phoma* sp. (WIELEWSKI; AUER; JUNIOR, 2002, p. 280). Botelho, Moraes e Menten (2008, p. 345) apresentam, ainda os que ocorrem em diferentes espécies desse mesmo gênero *Rhizopus*, *Aspergillus* spp., *Curvularia* sp., *Trichothecium* sp., *Cladosporium* sp., *Phoma* sp., *Phomopsis* sp., *Penicillium* sp., *Drechslera* sp., *Geotrichum* sp. e *Epicoccum* sp.

Segundo Bettiol e Morandi (2009, p. 143) apesar de ainda existir uma utilização dos agrotóxicos, o conceito vem mudando nas últimas décadas devido a estudos que comprovam as alterações ambientais que esses produtos podem provocar, como a contaminação dos animais, do solo, dos alimentos, da água, intoxicação dos agricultores, seleção de patógenos e pragas resistentes, surgimento de doenças devido ao seu uso intensivo, diminuição de microrganismos benéficos,

redução da biodiversidade, entre outros importantes fatores. Assim, considerando tais fatores nocivos, surge uma grande demanda por estudo que estimulem o emprego de produtos e técnicas naturais, como o emprego de substâncias biologicamente ativas.

Dentre os métodos de controle alternativo de patógenos, encontra-se a utilização de compostos naturais (extratos, bálsamos, óleos essenciais) extraídos de plantas medicinais ou não. Os óleos essenciais, caracterizados como metabólitos secundários de plantas e de baixa toxicidade a mamíferos, vem sendo amplamente estudados no controle de fitopatógenos (SILVA; BASTOS, 2007, p. 144). Mota et. al. (2002, p.5) ressalta que estudos realizados com os óleos essenciais tem demonstrado um grande potencial na ação fungitóxica direta, pela inibição do crescimento micelial e esporulação de fungos fitopatogênicos, ou indireta, pela indução de produção da fitoalexinas e outros compostos de defesa da planta.

As propriedades farmacobotânicas, químicas e farmacológicas de folhas de pitangueira, foram encontradas, no extrato da planta, vários compostos como sesquiterpenos, compostos fenólicos, alcalóides, entre outros grupos, com atividade antimicrobiana (AURICCHIO; BACCHI, 2003, p.59).

O gênero *Eucalyptus* sp. possui em sua composição química compostos secundários como o citronelol (aproximadamente 85%), geraniol, isopulegol, variações de pineno, cineol, guaiol, estragol, nopineno, canfeno, mirceno e cimeno, compostos de alto potencial no controle de doenças de plantas (COSTA, 1986, p.853).

O cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* L.) contém 14 a 20% de óleo volátil, 10 a 13% de ácido galotânico, ácido oleanólico, vanilina e a cromona eugenina. Nas folhas ele chega a representar aproximadamente 95% do óleo extraído (MAZZAFERA, 2003, p.233). O mecanismo de ação do eugenol ocorre em nível de membrana plasmática, juntamente com a inativação de enzimas e ou, no material genético celular. É possível que parte do efeito antimicrobiano do eugenol esteja relacionado com a sua natureza fenólica (BOAVENTURA et al., 2006, p.11).

De acordo com Corticchiato et. al. (1998, p.920) os óleos essenciais do gênero *Thymus* é muito utilizado para diversos compostos farmacêuticos e aromatizantes para vários produtos alimentares. Os extrativos de tomilho *Thymus vulgaris* possuem em sua composição o timol e carvacrol, além de γ -terpineno, linalol, borneol, timol, carvacrol metil éter, β -cariofileno e óxido de cariofileno,

propriedades que estão relacionadas ao seu potencial anti-septico, carminativa, expectorante, espasmolíticas e antioxidantes (HUDAIB et al., 2002, p. 693).

Diante do exposto, os óleos de pitanga, tomilho, cravo da Índia e eucalipto apresentam potencial no controle de fitopatógenos, bem como os trabalhos existentes são ainda insipientes. Ainda, em relação ao emprego desses óleos no controle de patógenos em semente de ipê são inexistentes, fato que demonstra a importância e potencial desse estudo.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial de óleos essenciais de pitangueira, tomilho, cravo da Índia e eucalipto no controle de fitopatógenos presentes em sementes de ipê amarelo, e no controle de *Fusarium* sp. *in vitro*, bem como analisar o potencial de indução de resistência.

1.1.2 Objetivos Específicos

Avaliar o efeito fungicida ou fungistático de óleos essenciais de pitangueira, tomilho, cravo da Índia e eucalipto sobre *Fusarium* sp. em condições *in vitro*;

Avaliar o potencial dos óleos no tratamento de sementes de ipê inoculadas com *Fusarium* sp., e sobre os parâmetros relacionados a germinação e a ativação de mecanismo de indução de resistência.

2. REFERÊNCIAL TEÓRICO

2.1 *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. Ex A. DC. Mattos)

Handroanthus chrysotrichus (Mart. ex DC.) Standl., conhecida como ipê-amarelo cascudo, ipê-do-morro, ipê, ipê-amarelo, aipé, ipê-tabaco, é uma árvore decídua, heliófita, que ocorre na Floresta Pluvial Atlântica do Brasil, principalmente na encosta mais elevada dos Estados do Espírito Santo até Santa Catarina. A espécie é largamente utilizada em arborização urbana devido ao seu florescimento intenso de cor amarela na planta sem folhagem e por apresentar de 4 a 10 m de altura e tronco de 30 a 40 cm de diâmetro, quando indivíduo adulto. O florescimento do ipê ocorre nos meses de agosto e setembro, e o período de maturação das sementes é curto, se comparado com o de outras espécies florestais nativas. A dispersão anemocórica das sementes ocorre nos meses de setembro a outubro (LORENZI, 1998, p.368).

A propagação da espécie ocorre preferencialmente de forma sexuada. Porém seu ecossistema pode ser afetado, principalmente, por fatores antrópicos, de forma que existam incrementos, seguidos de decréscimos e acréscimos durante o desenvolvimento, maturação e armazenamento de suas sementes, tornando sua germinação extremamente variável e corromper a produção. É necessário que se conheça o processo de desenvolvimento de sementes, pois a partir do conhecimento sobre a maneira com que se conduz a formação e produção da espécie é possível o estabelecimento de formas adequadas de conservação (NERY, 2005, p.95).

Carneiro (1986, p.562) ressalta que os poucos trabalhos existentes abordam apenas assuntos sobre ocorrência de microorganismos, sem aprofundar no efeito sobre a germinação e o desenvolvimento de plantas, sendo que os patógenos afetam a qualidade e reduzem a capacidade germinativa das sementes, bem como causam morte de plântulas recém emergidas. Santos, Medeiros e Santana (2001, p.65) concluíram que os fungos existentes em sementes de espécies nativas devem ser objeto de maior atenção, com avaliação de sua capacidade patogênica e análise da

frequência sobre as sementes, pois os patógenos podem fornecer subsídios para modelos epidemiológicos e causar danos à qualidade e à produção de mudas, em projetos de recuperação com espécies nativas ou para arborização de parques.

2.2 PITANGUEIRA (*Eugenia uniflora* L.)

A pitangueira (*Eugenia uniflora* L.), espécie frutífera pertencente à família das Myrtaceae, é uma planta tropical nativa do Brasil com ampla ocorrência na Mata Atlântica. Seus frutos são comestíveis e muito apreciados no Brasil, as propriedades da espécie possuem aplicação na medicina popular, principalmente como hipotensor, antigota, estomáquico e hipoglicemiante (LORENZI; MATOS, 2002, p. 544). O óleo essencial extraído das folhas de pitangueira apresenta propriedades farmacobotânicas, químicas e farmacológicas com vários compostos como sesquiterpenos, compostos fenólicos, alcalóides, entre outros grupos, com atividade antimicrobiana (AURICCHIO; BACCHI, 2003, p.60).

Segundo Mazaro et. al (2008, p.1827) a diversidade de metabólitos secundários presentes na pitangueira podem apresentar capacidade para utilização de compostos da planta na agricultura para ativação de rotas de defesa, com ativação de metabólitos como as fitoalexinas, assim sendo, podem apresentar potencial de utilização no controle alternativo de patógenos em plantas.

2.3 CRAVO DA ÍNDIA (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry)

A árvore *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry, conhecida popularmente como cravo-da-índia é uma espécie endêmica nas Molucas do Norte (Arquipélago de Molucas -Indonésia) e tem sido difundida pelos alemães desde a colonização para outros países e para outras ilhas do arquipélago. Atualmente os principais produtores de cravo-da-índia são Zanzibar, Madagascar e Indonésia (MAZZAFERA, 2003, p.235).

A exploração da espécie, ainda menor do que a demanda, ocorre principalmente em função da extração industrial do óleo essencial que pode ser adquirido a partir de seus botões florais, frutos, folhas e outras partes. É comum a utilização popular como especiaria, cosméticos e medicamento, sendo o chá dos botões florais como carminativo e estimulante das funções digestivas. Estudos fitoquímicos do cravo apresentam a presença de até 90% de óleo essencial, composto basicamente de eugenol acompanhado por aproximadamente 60 componentes de menor concentração (LORENZI; MATOS; 2002, p.544). O mecanismo de ação do eugenol ocorre em nível de membrana plasmática, juntamente com a inativação de enzimas e ou, no material genético celular. É possível que parte do efeito antimicrobiano do eugenol esteja relacionado com a sua natureza fenólica (BOAVENTURA et al., 2006, p.11).

2.4 TOMILHO (*Thymus vulgaris*)

Thymus vulgaris, conhecido popularmente como tomilho é uma planta pertencente à família Lamiaceae, originária da Europa. Comumente cultivada no sudeste e sul do Brasil por ser uma espécie medicinal, aromática e condimentar. A família possui 150 gêneros e cerca de 2800 espécies, dentre as quais várias se destacam como condimento, a sálvia (*Salvia officinalis*), manjeriço (*Ocimum basilicum*), orégano (*Origanum vulgare* L.), manjerona (*Origanum majorana* L.), entre outras (PORTE; GODOY, 2008, p.309).

Muitos pesquisadores relataram o potencial antimicrobiano dos óleos essenciais e de outros compostos puros das espécies da família Lamiaceae. De acordo com Corticchiato et. al. (1998, p.920) os óleos essenciais do gênero *Thymus* são muito utilizados como anti-séptico em diversos compostos farmacêuticos assim como aromatizante para vários produtos alimentares. Há diversos ecótipos de tomilho que se diferenciam em características morfológicas e na composição dos extrativos. São caracterizados por um sabor pronunciado balsâmico e picante e pelo forte e penetrante odor.

Hudaib et. al. (2002, p. 694) apresentam que o extrato de tomilho possui propriedades carminativa, expectorante, espasmolíticas e antioxidantes, propriedades estas que estão relacionadas ao timol e carvacrol. São compostos fenólicos, que estão presentes no óleo essencial de tomilho aos dois anos de cultivo, enquanto as plantas com cinco anos apresentam substâncias como γ -terpineno, linalol, borneol, timol, carvacrol metil éter, β -cariofileno e óxido de cariofileno.

Esses compostos presentes no óleo essencial de *T. vulgaris* são responsáveis pela capacidade antimicrobiana da espécie, sendo o timol o componente com maior potencial contra microorganismos.

2.5 EUCALIPTO (*Eucalyptus* sp.)

O gênero *Eucalyptus* é pertencente à família das Myrtaceae natural da Austrália e de outras regiões da Oceania, possui cerca de 700 espécies já identificadas, dentre as quais se destacam no Brasil as espécies *E. grandis*, *E. saligna*, *E. urophylla*, *E. viminalis*, híbridos de *E. grandis* X *E. urophylla*, *E. citriodora*, *E. camaldulensis* (DORAN, 1991, p.160). O eucalipto é uma planta de grande importância comercial principalmente pelo comércio de madeira, destinada a diversos fins como produção de papel e celulose, construção civil, carvoarias, lenha e produção de móveis. Além da madeira, muitas espécies possuem capacidade de produzir diferentes extrativos, alguns com ampla demanda no comércio mundial.

A maior capacidade de produção de óleos essenciais no *Eucalyptus* é a partir das glândulas existentes nos tecidos foliares. Em algumas espécies é possível observar, a olho nu, pequenos pontos translúcidos nas folhas, que são as chamadas glândulas. Os óleos essenciais do eucalipto são de origem biossintética e não são fundamentais para a manutenção da vida do vegetal, porém sua produção pode estar relacionada à questão de adaptação da planta em diferentes ambientes. Alguns estudos relatam que os eucaliptos produzem esses metabolitos secundários especificamente para defesa da planta contra insetos, efeito alelopático, resistência ao frio no estágio de plântulas e diminuição da perda de água. Os óleos possuem uma complexa formação com uma variação de 50 a 100 compostos orgânicos

voláteis, dentre eles, os hidrocarbonetos, alcoóis, aldeído, cetona e ácidos (DORAN, 1991, p.161).

A planta medicinal eucalipto possui em sua composição química o cineol em maior quantidade, mínimo 70%. O óleo industrial tem como principal componente o felandreno, e a piperitona, partir da qual é fabricado o timol (preservativo para gomas, pastas, etc) e o mentol (utilizado em produtos medicinais e outros aromatizantes), também pode ser encontrado em algumas espécies o citral como importante componente. A formulação dos óleos essenciais varia conforme a espécie que irá produzi-lo. O entendimento das propriedades antimicrobianas e elicitoras dos compostos secundários existentes nessa planta são necessários para contribuir na aquisição de novas técnicas de controle de doenças de plantas (VITTI; BRITO, 2003, p. 14).

Como foi apresentado, além da planta produzir os extrativos em sua própria defesa, os estudos químicos apresentam compostos com capacidade antimicrobiana, assim, o gênero *Eucalyptus* pode ser considerado um importante produtor de óleos essenciais com utilização no controle de patógenos.

2.6 CONTROLE ALTERNATIVO DE PATÓGENOS

As plantas possuem um elaborado arranjo de ferramentas defensivas em associação aos patógenos, assim como os patógenos possuem meios para superar as formas de resistência das plantas. Apesar das plantas se defenderem de diferentes maneiras contra patógenos potenciais, suas estratégias são categorizadas na literatura com passiva (presente antes do reconhecimento do patógeno) e ativa (induzida após o reconhecimento dos patógenos pelo hospedeiro) (TRIGIANO; WINDHAM; WINDHAM, 2010, p. 576).

Segundo os mesmos autores, as plantas são capazes de sintetizar diversos componentes de baixo peso molecular (metabólitos secundários) e muitos desses produtos estão presentes nas concentrações que afetam os patógenos. Os produtos naturais antimicrobianos produzidos por plantas podem ser fitoanticipinas, que são componentes de baixo peso molecular pré-estabelecidos estocados na célula da

planta. E as fitoalexinas, são metabolitos secundários, formadas após a infecção por agentes bióticos, ou seja, mecanismo de proteção em resposta a um patógeno.

Os agentes antimicrobianos extraídos de plantas são capazes de agir como reguladores do metabolismo intermediário, ativando ou impedindo reações enzimáticas, acarretando diretamente uma síntese enzimática, ou mesmo alterando as estruturas das membranas (SINGH; SHUKLA, 1984, p.313).

Assim sendo, a utilização de extrato bruto ou óleos essenciais extraídos de plantas tem apresentado grande potencial contra patógenos por possuírem capacidade de ação fungicida e fungistática, sendo uma proposta de controle alternativo devido a sua baixa toxicidade ao meio ambiente, principalmente quando comparadas á formas de controle químico.

3. METODOLOGIA

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Fitossanidade e Bioquímica e no Laboratório de Análise de Sementes da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Campus Dois Vizinhos, Paraná (PR). Os frutos de ipê amarelo foram coletados de indivíduos adultos em idade de reprodução, localizados no mesmo Campus. Essas “capsulas” de ipê apresentaram características de ponto de maturação fisiológica, de acordo com o proposto por Fonseca et. al. (2005). Dentre essas características pode-se citar a coloração marrom e o início do surgimento de uma fissura nos frutos. Após a coleta dos frutos, as sementes foram separadas e eliminadas aquelas com danos e lesões.

3.1 EXPERIMENTO I

3.1.1 ISOLAMENTO DE *Fusarium* sp. EM SEMENTES DE IPÊ AMARELO

Em teste prévio realizado, observou-se que o principal fungo presente em sementes de ipê amarelo foi o *Fusarium* sp. Nesse sentido, para isolamento do mesmo das sementes utilizou-se a técnica de isolamento direto, ou seja, as sementes foram previamente desinfestadas com solução de álcool a 70%, e acondicionadas em caixas gerbox (11 x 11 x 3,5 cm) contendo duas folhas de papel de filtro umedecidas com água destilada, esterilizadas em autoclave (120°C e 1 atm por 30 minutos). As caixas gerbox foram mantidas em BOD (26°C e fotoperíodo 12horas.) por 7 dias para desenvolvimento dos patógenos. Para o isolamento, as estruturas do patógenos foram retiradas, com auxílio de uma alça de platina estéril, das sementes infectadas e colocadas, diretamente, em para placas de petri® estéreis com meio de cultura BDA (Batata Dextrose Ágar).

Assim que os fungos se desenvolverem nas placas de petri®, os mesmos foram repicados em BDA, até a obtenção de colônia pura de *Fusarium* sp

3.1.2 . EXPERIMENTO DE CRESCIMENTO MICELIAL

Foi realizado em condições *in vitro*, a avaliação do efeito volátil dos diferentes óleos no controle *Fusarium* sp. isolado das sementes de ipê. Para tanto, foram aplicados cinco tratamentos, sendo os óleos essenciais de Pitangueira, Tomilho, Eucalipto, Cravo da Índia, e a testemunha em água destilada, todos com 4 repetições, sendo a unidade experimental uma placa de Petri. Após verter o meio de cultura BDA (Batata Dextrose Ágar) em placas de petri, discos de 3 mm de diâmetro de ágar, colonizados pelo fungo, foram transferidos para o centro da placa. Na tampa da placa, foram fixadas fitas de papel filtro, autoclavado, nestas foram e depositados 20 microlitros de óleo essencial para cada tratamento. Em seguida, as placas foram fechadas, e incubadas em BOD à 26 °C com fotoperíodo de 12 horas. A avaliação do crescimento micelial foi realizada através de medições em centímetros com uma régua, nos tempos de 48 e 72 h após a implantação do experimento.

3.2 EXPERIMENTO II

3.2.1 TRATAMENTO DE SEMENTES DE IPÊ AMARELO

As sementes de ipê amarelo, que já estavam naturalmente infestadas, foram tratadas pelo método de volatilização. Para tanto, 100 de sementes foram acondicionadas em cada uma das latas de inox (tipo cadinho) e junto com essas foram colocadas fitas de papel filtro com 20 microlitros dos óleos essenciais de Pitangueira, de Tomilho, Eucalipto, Cravo da Índia e água destilada para testemunha aplicado nas mesmas. Os cadinhos foram lacrados com papel filme e mantidos em BOD por 24 horas. Após esse período as sementes foram submetidas ao teste de germinação.

3.4. METODOLOGIAS DAS ANÁLISES DE VIGOR

A percentagem de germinação foi determinada baseada nas Regras de Análises de Sementes – RAS (BRASIL, 2009, p.399), sendo 4 repetições de 25 sementes para cada tratamento. As sementes foram colocadas para germinar em rolos de papel Germitest® e alocadas em estufa tipo BOD em uma temperatura de 25°C com fotoperíodo de 12 horas. Assim que observou-se o desenvolvimento da testemunha, os tratamentos foram analisados e tabulado o número de plântulas desenvolvidas em suas devidas repetições.

A avaliação do comprimento de plântula (em centímetro) foi realizada com auxílio de papel milimetrado, conforme proposto por Nakagawa (1999, p.18).

Para o teste de incidência de patógenos em sementes tratadas, as sementes foram colocadas em caixas gerbox, com 25 para cada repetição, com papel filtro umedecido com água destilada. Os gerbox foram levados para BOD em uma temperatura de 25°C com fotoperíodo de 12 horas durante 7 dias. Após esse período de incubação, foram feitas as análises através de contagem no número de sementes que estavam contaminadas com *Fusarium* sp. ou não.

3.3 METODOLOGIA DAS ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Com as amostras de plântulas obtidas do teste de germinação, procedeu-se as análises bioquímicas, sendo avaliado os parâmetros de proteínas totais, atividade das enzimas peroxidases, fenilalanina amônia-liase, quitinase e glucanase.

Após as análises de germinação e vigor as amostras de plântulas foram imediatamente armazenadas em papel alumínio e congeladas até as avaliações. As amostras foram uma mescla entre todas as partes do vegetal (folhas, talo e raízes).

Nas análises de proteínas totais, as amostras das plântulas foram maceradas em almofariz com 10 ml de tampão fosfato 0,2 M (pH 7,5). Em seguida, o material foi levado a centrifuga (14.000g / 10 min a 4°C) e o sobrenadante coletado. Para quantificação do conteúdo total de proteínas das amostras utilizou-se o teste de Bradford (1976). A leitura de proteínas totais foi realizada em espectrofotômetro a 630 nm, utilizando soro albumina bovina como padrão.

As peroxidases foram pelo método preconizado por Matsuno e URITANI (1972, p.1091), onde foi retirada uma amostra das plântulas de cada unidade experimental, colocada em um recipiente de porcelana refrigerado, pois esta análise foi processada a temperatura inferior a 4 °C. As amostras foram maceradas com 3,0 ml tampão fostato 0,05 M (pH 7) com mais 0,005g polivinilpirrolidona. O extrato foi acondicionado em tubos ependorfe devidamente identificados que foram levados para a centrífuga por 20 minutos, a 4 °C e a 5000 rpm. Após centrifugação, foi retirado 2,0 mL do sobrenadante e colocado em tubos de ensaios identificados, onde já estava o preparado de 3,0 mL do tampão citrato (pH 5,0) mais 0,5 ml água oxigenada a 3 % e mais 0,5 ml guáiacol 0,5 %. A solução foi agitada e colocada por 15 minutos em banho-maria 30°C e após 10 minutos em gelo para pararem as reações. Finalmente, foram adicionados 0,5 mL de bisulfito de sódio, agitou-se solução e para a leitura a 450 nm em espectrofotômetro, obtendo-se assim os valores de absorbância.

A determinação da atividade da fenilalanina amônia-liase (FAL) foi por quantificação colorimétrica do ácido trans-cinâmico liberado do substrato fenilalanina, conforme metodologia descrita por Kuhn (2007), onde é indicado utilizar 0,25 g da amostra com mais 3,0 mL do tampão TRIS – HCl pH 8,0. Este extrato foi acondicionado em tubos ependorfe e centrifugado por 10 minutos, a 4 °C a 6000 rpm. Após, uma alíquota de 200 µL foi transferida para tubo de ensaio, acrescentando-se mais 3,0 mL do tampão de extração. A solução foi agitada em vórtex, obtendo-se assim, o extrato enzimático. Deste extrato, 1,5 mL foi transferido para outro tubo de ensaio, com mais 1,0 mL do tampão de extração e 0,5 mL de fenilalanina. Novamente, agitou-se a solução em vórtex para homogeneização. E após, os tubos foram incubados em banho-maria por 45 minutos a 40°C. Depois de retirados do banho-maria, os tubos foram colocados em banho de gelo por 5 minutos para interromper a reação e assim pode-se realizar a leitura em espectrofotômetro a 290 nm.

Para dosagem das atividades de quitinase e β -1,3-glucanase as amostras foram maceradas em 2,0 mL de tampão acetato 100 mM (pH 5,0), com posterior centrifugação (20.000 g por 25 min, a -4 °C). O sobrenadante foi coletado e utilizado para a avaliação da atividade das enzimas. A atividade enzimática da quitinase foi avaliada através da liberação de fragmentos solúveis de “CM-chitin-RBV”, a partir de quitina carboximetilada marcada com remazol brilhante violeta. Para determinação

espectrofotométrica das atividades de β -1,3-glucanase nos extratos utilizou-se como substrato solução de carboximetilcurdlan-remazol azul brilhante (CM-Curdlan-RBB 4 mg.ml⁻¹, Loewe Biochemica GmbH), de acordo com metodologia desenvolvida por Wirth e Wolf (1992) e com o procedimento descrito por Guzzo e Martins (1996, p.451).

3.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O delineamento estatístico para ambos os experimentos foi inteiramente casualizado, com quatro repetições. Após a compilação, foi verificada a normalidade dos dados pelo Teste de Lilliefors e quando aplicável, as médias observadas foram transformadas.

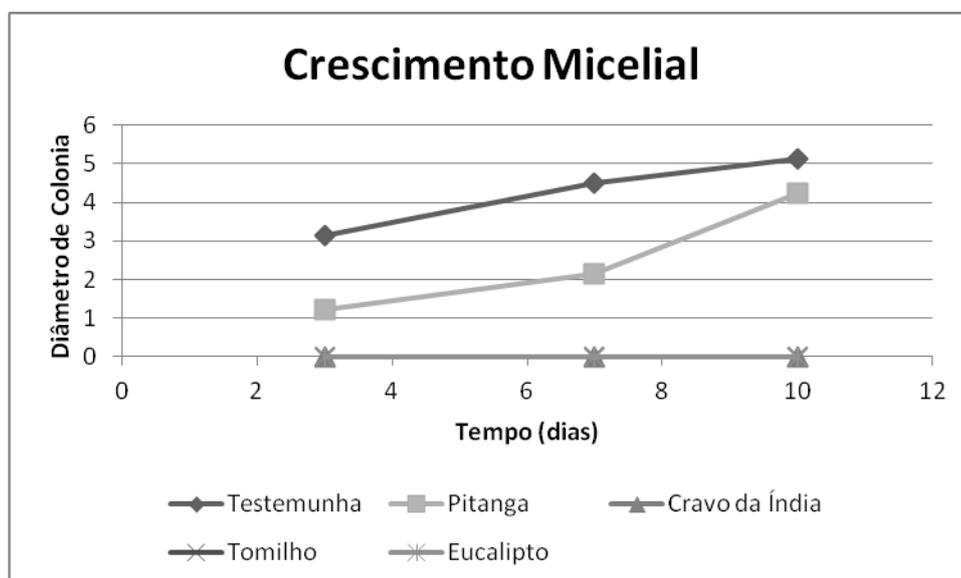
Atendida as pressuposições do modelo estatístico, foi testado o nível de significância dos tratamentos pelo teste T no nível de 0,05% de probabilidade de erro. Quando significativos os tratamentos foram analisados pelo teste de Tukey ($p=0,05$).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 EXPERIMENTO I

4.1.1 Crescimento micelial de *Fusarium* sp.

Os resultados mostraram que o crescimento micelial de *Fusarium* sp. foi inibido quando submetido aos compostos voláteis dos óleos de cravo da Índia, tomilho e eucalipto, sendo assim, esses óleos possuem capacidade no controle do fungo por apresentar comportamento fungicida. Os compostos do óleo de pitangueira demonstraram efeito fungistático, de forma que o mesmo reduziu o desenvolvimento do fungo quando comparado à testemunha, porém não teve ação de inibição total conforme observado nos demais óleos (Gráfico 1).



**Gráfico 1: Crescimento Micelial de *Fusarium* sp. submetido à diferentes tratamentos *in vitro*. UTFPR – Dois Vizinhos - PR
Fonte: O Autor, 2015.**

Outros trabalhos já demonstraram o efeito desses óleos sobre fitopatógenos, no entanto, com técnicas de aplicação diferentes da utilizada nesse trabalho. Como os desenvolvidos por Salgado et al. (2003, p. 251), no qual observaram que os óleos de *E. camaldulensis* e *E. citriodora* tiveram efeito na redução do crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* em concentração de 500 mg/Kg, e uma diferença ainda mais significativa para óleo de *E. urophylla*.

Venturoso et al. (2011, p.21) verificaram inibição total do crescimento micelial de *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Colletotrichum* sp., *Fusarium solani* e *Phomopsis* sp. quando submetidos a extrato de cravo-da-índia, o que corrobora com os resultados obtidos no presente trabalho.

Também Zambonelli et al. (1996) observaram que o óleo essencial de tomilho a 800 ppm possui potencial na redução do crescimento micelial de *C. lindemuthianum* e *Pythium ultimum* e constataram, a partir de microscopia eletrônica de varredura, a degeneração e extravasamento do citoplasma celular de hifas.

4.2 EXPERIMENTO II

4.2.1 Tratamento de sementes

Os resultados quanto a germinação de sementes de ipê amarelo obtidos nesse trabalho corroboram com os valores de referência para sementes de ipê amarelo, estando entre 30 a 41%, apresentados por Botelho (2006, p. 41), sendo que nesse trabalho, a germinação ficou entre 26 a 40%, variando com o tratamento recebido (Tabela 1). Ainda, em trabalho realizado com a mesma espécie desse estudo, *Handroanthus chrysotrichus*, Martins, Lago e Cicero (2011, p. 89) obtiveram 30% de germinação antes do armazenamento das sementes.

Observando a tabela 1, a média do tratamento com óleo de tomilho e pitanga não apresentaram diferença da testemunha para o potencial germinativo das sementes tratadas. O efeito do óleo de tomilho além de não ter causado danos na germinação, demonstrou menor incidência de patógenos nas sementes. O potencial

do óleo de tomilho pode estar relacionado à presença de compostos, como timol e carvacrol que possuem atividade antimicrobica contra diversos tipos de microorganismos. Zambonelli et al. (1996, p.144) explica que a atividade antifúngica é pela degeneração das hifas que causa a liberação do conteúdo celular.

Já os óleos de eucalipto e cravo se diferiram da testemunha, apresentando redução no percentual de germinação, possivelmente, por efeito danoso no processo germinativo, o que leva a considera-los inviáveis no tratamento de sementes de ipê amarelo, apesar do potencial de redução da incidência de patógenos nas sementes.

A ação dos óleos sobre a germinação já foi observado em outros trabalhos como os descritos por Steffen (2010, p.202), no qual observaram que a incubação de sementes de Eucalipto ao óleo de *Eucalyptus grandis* às concentrações de 25 e 50 microlitros, aumentaram a germinação em 15% e 11,67%, respectivamente.

Conforme Gonçalves et al. (2003, p.23) o tratamento de sementes de feijão com Cravo da Índia a 10%, inibiu o desenvolvimento de *Aspergillus flavus*, *Penicillium spp* e *Macrophomina phaseolina*, porém, reduziu o índice de velocidade de germinação.

Os resultados em relação ao comprimento de plântulas mostraram que não houve diferenças estatísticas entre os tratamentos e que, apesar das variações dos índices de germinação, os tamanhos de plântulas não foram influenciados em relação aos diferentes tratamentos. Quando comparado com Santos (2007, p. 24) que obteve média de comprimento de plântula de *Handroanthus chrysotrichus* em 3,79 cm, os dados obtidos nesse trabalho foram bastante representativos, sendo que a média geral foi de 5,10 cm, como observado na tabela 1.

Tabela 1: Germinação, Incidência de Patógenos e Comprimento de Plântulas em sementes de Ipê amarelo tratadas com óleos essenciais e submetidas ao teste de germinação. UTFPR - Dois Vizinhos – PR. tratamentos em sementes

TRATAMENTO	GERMINAÇÃO (%)	COMPRIMENTO DE PLÂNTULA (cm)	INCIDÊNCIA DE <i>Fusarium</i> sp. (%)**
Cravo da Índia	26b	5,001ns	35ab*
Eucalipto	26b	5,401	37ab
Pitanga	37ab	5,224	45a
Tomilho	40 ^a	4,788	16b
Testemunha	40 ^a	5,077	47a
CV (%)	15,8	12,23	35,48

Fonte: O Autor, 2015.

ns=não significativo

*Médias distintas diferem entre si pelo teste de Tukey, com 95% de significância.

**Após 7 dias de incubação.

Em, relação as análises bioquímicas, os tratamentos não apresentaram diferenças significativas para as análises realizadas, sendo FAL, quitinase e β 1,3 glucanase (Tabela 2), o que permite-nos a interpretar que não foi possível observar o processo de indução de resistência por parte dos óleos e sim que os tratamentos tiveram ação diretamente nos patógenos.

Pesquisas realizadas com óleo essencial tem indicado o potencial da flora nativa e exótica no controle de fitopatógenos, tanto por sua indução de fitoalexinas, indicando a presença de compostos com característica de elicitores, quanto pela ação fungitóxica direta, inibindo o crescimento micelial e germinação de esporos (SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN; CRUZ, 1997, p. 131).

Tabela 2: Análises Bioquímicas de plântulas de ipê amarelo tratadas com óleos essenciais e submetidos ao teste de germinação. UTFPR – Dois Vizinhos - PR

TRATAMENTO	FAL	QUITINASE	β 1,3 GLUCANASE
Cravo da Índia	0,001696268ns	0,001675ns	0,107204147ns
Eucalipto	0,001721002	0,001825	0,117370620
Pitanga	0,001814475	0,001575	0,074395004
Tomilho	0,001772114	0,001575	0,082650784
Testemunha	0,001883209	0,001175	0,068249957
CV (%)	13,32	27,49	51,65

Fonte: O Autor, 2015.

ns= não significativo

A partir dos dados obtidos, é possível observar que a eficácia do óleo de tomilho está relacionada a algum composto que teve efeito direto no controle do patógeno e não que houve a indução de resistência dos óleos.

5. CONCLUSÃO

Os óleos essenciais de cravo da Índia, tomilho e eucalipto possuem ação fungicida, enquanto que o de pitangueira possui ação fungistática no controle de *Fusarium* sp. em condições *in vitro*.

O óleo de tomilho não causou danos nas plântulas, bem como reduziu a incidência de patógenos.

Não observou-se efeito dos óleos no processo de indução de resistência à patógenos em plântulas de ipê amarelo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AURICCHIO, Mariângela Tirico; BACCHI, Elfriede M Marianne. Folhas de *Eugenia uniflora* L. (pitangueira): propriedades farmacobotânicas, químicas e farmacológicas. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo (SP), v. 62, n. 1, p. 55-61, 2003.

BETTIOL, Wagner; MORANDI, Marcelo A. B; Biocontrole de Doenças de Plantas – Uso e Perspectivas. **Embrapa Meio Ambiente**. Jaguariuna (SP) n. 1, p139-150, 2009.

BONALDO, Solange M. ; SCHWAN-ESTRADA, Kátia R. F.; STANGARLIN, José R.; TESSMANN, Dauri J.; SCAPIM, Carlos A. Fungitoxicidade, Atividade Elicitora de Fitoalexinas e Proteção de Pepino contra *Colletotrichum lagenarium*, pelo Extrato Aquoso de *Eucalyptus citriodora*. **Fitopatologia Brasileira**. Piracicaba (SP), v. 1, n. 29, p. 128-135, 2003.

BOAVENTURA Ariely Oliveira; CASTRO, Ana Hortência Fonseca; COSTA, Maria Cristina Mendes; SILVEIRA, Ivana Aparecida da. Avaliação das atividades antifúngicas e antibacterianas do cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* L.). **Anais do CNPq**. Belo Horizonte (MG), p. 11-12, 2006.

BOTELHO, Luana da Silva; MORAES, Maria Heloisa Duarte; MENTEN, José Otávio Machado; Fungos associados às sementes de ipê-amarelo (*Tabebuia serratifolia*) e ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa*): incidência, efeito na germinação e transmissão para as plântulas. **Summa Phytopathol**. Botucatu (SP), v.34, n.4, p. 343-348, 2008.

BOTELHO, Luana da Silva; MENTEN, José Otávio Machado; Fungos associados às sementes de ipê-amarelo (*Tabebuia serratifolia*) e ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa*), aroeira-pimenteira (*Schinus terebinthifolius*) e aroeira-salsa (*Schinus molle*): incidência, efeito na germinação, transmissão para plântulas e controle. Piracicaba (SP), p. 1-115, 2006.

BRADFORD, Marion M.; A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, Orlando (FL), v. 72, p. 248 - 254, 1976.

BRASIL. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. p. 399, 2009.

CARNEIRO, J.S. Microflora associada a sementes de essências florestais. **Fitopatologia Brasileira**, v.11, p.557-566, 1986.

CORTICCHIATO, Marc; TOMI, Felix; BERNARDINI, Antoine François; CASANOVA, Joseph. Composition and infraspecific variability of essential oil from *Thymus herba barona* Lois. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.26, p.915-932, 1998.

COSTA, Aloisio. Fernandes. Farmacognosia. Fundação Calouste Gulbenkian. **Editora Calouste Gulbenkian**. Lisboa, v. 1 p. 853, 1986.

DORAN, J. C; BROPHY, J.J; Tropical red gums: a source of 1,8-cineole-rich *Eucalyptus* oil. **New forest**, n.4, p.157-178, 1990.

DOTTO, Marcelo; PIROLA, Kelli; WACLAWOVSKY, Alessandro Jaquiel, MAZARO, Sérgio Miguel, WAGNER JUNIOR, Américo. Aplicação pré-colheita de extratos vegetais em morangueiro. **Revista Brasileira de Agroecologia**, n. 9; p. 240-247, 2014.

FONSECA, Fernanda. L; MENEGARIO, Cristiane; MORI, Edson S; NAKAGAWA, João. Maturidade das sementes de Ipê-amarelo (*Tabebuia chrysotricha* (Mart. DC.) Standl. **Scientia Florestalis**, Piracicaba (SP), n.69, p.141, 2005.

GONÇALVES, A.L; ALVES, A Filho; MENEZES, H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo (SP), v.72, n.3, p.353-358, 2005.

GONÇALVES, Edilma Pereira et al. Tratamento químico e natural sobre a qualidade fisiológica e sanitária em sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) armazenadas. **Revista Biociências**, v. 9, n. 1, p. 1-7, 2008.

GUZZO, Sylvia Dias.; MARTINS, E.M.F. Local and systemic induction of β -1,3-glucanase and chitinase in coffee leaves protected against *Hemileia vastatrix* by *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.144, p.449-454, 1996.

HUDAIB, Mohammad; SPERONI, Ester; PIETRA, Anna Maria Di; CAVRINI, Vanni. CG/EM evaluation of thyme (*Thymus Vulgaris* L.) oil composition and variations during the vegetative cycle. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.29, p. 691–700, 2002

LORENZI, Harri. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. **Editora Plantarum**. Nova Odessa (SP), p. 368, 1998.

LORENZI, Harri; MATOS, Francisco José de Abreu. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. **Instituto Plantarum**. Nova Odessa (SP). v. 1, p. 544, 2002.

KUHN, Odair José. Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-S-metil e *Bacillus cereus*: aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de crescimento e produção. **Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, Piracicaba (SP), p. 140, 2007.

MARTINS, Leila; LAGO, Antônio Augusto do; CICERO, Silvio Moure. Qualidade Fisiológica De Sementes De *Tabebuia avellanedae* E *Tabebuia impetiginosa* Submetidas À Ultra-Secagem. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 33, n. 4 p. 626 - 634, 2011.

MATSUNO, Hiroshi; URITANI, Ikuzo. Physiological behavior of peroxidase isozymes in sweet potato root tissue injured by cutting or with black rot. **Plant and Cell Physiology**, Tokio, v.23, p.1091-1101, 1972.

MAZZAFERA Paulo. Efeito alelopático do extrato alcoólico do cravo-da-índia e eugenol. **Revista Brasil**. Campinas (SP), v.26, n.2, p.231-238, 2003.

MAZARO, Sergio Miguel; CITADIN, Idemir; GOUVÊA, Alfredo de; LUCKMANN, Daiane; GUIMARÃES, Sabrina Santos. Indução de fitoalexinas em cotilédones de soja em resposta a derivados de folhas de pitangueira. **Ciência Rural**. Santa Maria (SC), v. 38, n. 7, p. 1824-1829, 2008.

MOTA, Joacida C. O.; PESSOA, Maria Nenmaura G.; VIANA, Francisco M. P.; NETO, Manoel Andrade. Efeito de extratos e óleos essenciais de plantas medicinais no controle *in vitro* de *Lasiodiplodia theobromae*. **Fitopatologia Venez.** Fortaleza (CE) v. 15, n. 1, p. 1 – 6, 2002.

NASCIMENTO, Walnice Maria Oliveira do; CRUZ, Eniel David; MORAES, Maria Heloisa Duarte; MENTEN, José Otávio Machado. Qualidade sanitária e germinação de sementes de *pterogyne nitens tull.* (leguminosae – caesalpinioideae). **Revista Brasileira de Sementes**, Piracicaba (SP), v.28, n.1, p.149-153, 2006.

NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados no desempenho das plântulas. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina (PR), n. 2, p. 1-24, p. 218, 1999.

NERY, Marcela Carlota. Aspectos morfológicos do desenvolvimento de sementes de *Tabebuia serratifolia* Vahl Nich. **Editora da UFLA**. Lavras (MG), p. 95, 2005.

PORTE, Alexandre; GODOY, Ronoel. L. O. Chemical composition of *Thymus vulgaris* L. (thyme) essential oil from Rio de Janeiro state (Brazil). **Journal of the Serbian Chemical Society**, v.73, n.3, p.307-310, 2008.

RODRIGUES, Antonia Alice Costa; NETO, Egídio Bezerra; COELHO, Rildo Sartori Barbosa. Indução de Resistência a *Fusarium Oxysporum* f. sp. *Tracheiphilum* em Caupi: Eficiência de Indutores Abióticos e Atividade Enzimática Elicitada. **Fitopatologia Brasileira**, Recife (PE),v. 31, n.5, p. 492-499, 2006.

SALGADO, Ana Paula Soares P; CARDOSO, Maria Das Graças Souza, PAULO Estevão De; SOUZA, Josefina Aparecida De; ABREU, Celeste Maria P. PINTO, José Eduardo B. P. Avaliação Da Atividade Fungitóxicas De Óleos Essenciais de Folhas De *Eucalyptus* Sobre *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* E *Bipolaris sorokiniana*. **Ciênc. agrotec.**, Lavras. V.27, n.2, p.249-254, 2003.

SANTOS, Álvaro Figueredo dos; MEDEIROS, Antonio Carlos de Souza; SANTANA, Dalva Luiz de Quiroz. Fungos Associados Às Sementes De Espécies Arbóreas Da Mata

Atlântica. **Embrapa Florestas-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, Colombo(PR), n. 43, p. 57-70, 2001.

SANTOS, Fabiana Silva dos. Biometria, germinação e qualidade fisiológica de sementes de *Tabebuia chrysotricha* (Mart. ex A. Dc.) Standl. provenientes de diferentes matrizes. Jaboticabal (SP), p.1-57, 2007.

SCHWAN-ESTRADA, Kátia Regina Freitas; STANGARLIN, José Renato; CRUZ, MARIA Eugênia Da Silva. Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos. **Floresta**, v. 30, n. 12, 1997.

SILVA, Danielle Mariana. M.H; BASTOS, Cleber N. Atividade Antifúngica de Óleos Essenciais de Espécies de *Piper* Sobre *Crinipellis pernicioso*, *Phytophthora palmivora* e *Phytophthora capsici*. **Fitopatologia Brasileira**, Macapá (AP), p. 143-145, 2007.

SILVA, Paulo Henrique Müller da; BRITO, José Otávio; JUNIOR, Francides Gomes da Silva. Potential of eleven *Eucalyptus* species for the production of essential oils. **Scientia Agricola (Piracicaba, Braz.) [online]**. Piracicaba (SP), v. 63, n.1, p. 85-89, 2006.

SINGH, K.V.; SHUKLA, N.P. Activity on multiple resistant bacteria of garlic (*Allium sativum*) extract. **Fitoterapia**, v.55, p.313-315, 1984.

STEFFEN, Ricardo Bemfica. Óleo essencial de eucalipto como bioestimulador da micorrização e do estabelecimento de mudas de eucalipto e sibipiruna em solo contaminado com cobre. **Tese de Doutorado**. p. 229, 2010.

TRIGIANO, Roberto N.; WINDHAM, Mark T.; WINDHAM, Alan S. Fitopatologia: Conceitos e Exercícios de Laboratório. **Editora Artmed**. Porto Alegre (RS), v. 1, n. 2, p. 576, 2010.

VENTUROSO, Luciano dos Reis ; BACCHI, Lilian Maria Arruda; GAVASSONI, Walber Luiz; CONUS, Lenita Aparecida; PONTIM, Bruno Cesar Alvaro; BERGAMIN, Anderson Cristian. Atividade antifúngica de extratos vegetais sobre o desenvolvimento de fitopatógenos. **Summa Phytopathol.**, Botucatu (SP), v. 37, n. 1, p. 18-23, 2011.

VITTI, Andrea M. Silveira; BRITO, José Otávio. Óleo essencial de eucalipto. **Documentos Florestais**. São Paulo (SP), n. 17, p. 1-26, 2003.

WIELEWSKI, Patrícia; AUER, Celso Garcia; JUNIOR, Albino Grigoletti. Levantamento de doenças em ipê-amarelo (*Tabebuia chrysotricha*) em Curitiba, PR. **Revista Floresta**. Curitiba (PR), p.277-281, 2002.

ZAMBONELLI A, DAULERIO AZ, BIANCHI A, ALBASINI A. Effects of essential oils on phytopathogenic fungi in vitro. **J Phytopathol**, p. 491-494, 1996.