



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE  
PERNAMBUCO**  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM FITOPATOLOGIA**

**Tese de Doutorado**

**AÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS NO CONTROLE DE  
*Sclerotium rolfsii* Sacc. EM FEIJÃO-CAUPI**

**Ananda Rosa Beserra Santos**

**Recife – PE  
2019**

**ANANDA ROSA BESERRA SANTOS**

**AÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS NO CONTROLE DE**  
***Sclerotium rolfsii* Sacc. EM FEIJÃO-CAUPI**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Fitopatologia.

**COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:**

Orientador: Prof. Dr. Delson Laranjeira

Coorientador: Dr. Candido Athayde Sobrinho

**RECIFE – PE**  
**FEVEREIRO – 2019**

(CIP) Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE  
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

S237a Santos, Ananda Rosa Beserra  
Ação de óleos essenciais no controle de *Sclerotium rolfsii* Sacc.  
em feijão-caupi / Ananda Rosa Beserra Santos. – 2019.  
102 f. : il.]

Orientador: Delson Laranjeira.  
Coorientador: Candido Athayde Sobrinho.  
Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco,  
Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Recife, BR-PE, 2019.  
Inclui referências.

1. Feijão-de-corda - Doenças e pragas 2. Fungos - Controle  
3. Essências e óleos essenciais - Uso terapêutico 4. Análise  
cromatográfica I. Laranjeira, Delson, orient. II. Athayde Sobrinho,  
Candido, coorient. III. Título

CDD 632

**AÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS NO CONTROLE DE**  
***Sclerotium rolfsii* Sacc. EM FEIJÃO-CAUPI**

**ANANDA ROSA BESERRA SANTOS**

Tese apresentada e aprovada pela Banca Examinadora em: 21/02/2019

**ORIENTADOR:**

---

Prof. Dr. Delson Laranjeira

**EXAMINADORES:**



---

Dr. Candido Athayde Sobrinho (EMBRAPA)

---

Profa. Dra. Elineide Barbosa de Souza (UFRPE)

---

Profa Dra. Rejane Pereira Neves (UFPE)

---

Prof. Dr. André Angelo Medeiros Gomes (UFRPE)

**RECIFE – PE**  
**FEVEREIRO – 2019**

*O próprio Senhor irá à sua frente e  
estará com você; ele nunca o deixará,  
nunca o abandonará. Não tenha medo!*

*Não se desanime!*

*Deuteronômio 31, 8*

*Aos meus amados pais, Manoel e Francisca, por  
todo amor, incentivo, paciência e dedicação.  
Aos meus irmãos, Marcus e Clara, por serem meus  
grandes amigos.  
Ao meu querido esposo Marcelo,  
por todo amor, carinho, apoio e compreensão.*

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

À Deus e à Nossa Senhora, por guiarem meus passos, conduzindo-me sempre em Seus planos;

À Universidade Federal Rural de Pernambuco e ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia pela oportunidade de aperfeiçoamento;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão das bolsas de estudo;

Ao meu orientador Prof<sup>o</sup>. Delson Laranjeira, pela orientação e confiança;

Ao meu co-orientador Dr. Candido Athayde Sobrinho pelos preciosos ensinamentos;

Ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia pelos ensinamentos transmitidos, em especial à Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Sônia Maria;

À Embrapa Meio-Norte pela infra-estrutura e recursos financeiros disponibilizados para realização deste trabalho e aos pesquisadores e técnicos, em especial ao Dr. Paulo Henrique Soares e aos técnicos do laboratório de Fitossanidade, Vera Lúcia e Marcos Alves;

Ao Professor Sidney Gonçalo de Lima e ao Laboratório de Geoquímica Orgânica (LAGO) na Universidade Federal do Piauí (UFPI) e ao Professor Cícero Nicolini e à Universidade Estadual do Piauí (UESPI) por todo apoio proporcionado;

Às amigas durante essa caminhada: Ana Kelly, Mariana Silva, Emanuel Feitosa, Rezanio Martins, Luana Silva, Tamiris Rêgo, Tarciana Silva, Raycenne Rosa, Ana Dulce, Bárbara Malta, Leandro Velez e Iwanne Coelho pela sincera amizade;

À minha cunhada, cunhados e sogros, pelo respeito;

Aos funcionários Darcy, Romildo e Adelmo pela colaboração nos momentos necessários;

Aos amigos da Embrapa Meio Norte: Aline Negreiros, Nadja Nara, Gisele Holanda, Sarah Sales, Gabriela França, Leovanio Barbosa, Aurélio Ribeiro e Francisco José;

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS.....	v
RESUMO GERAL .....	vii
GENERAL ABSTRACT .....	viii
CAPÍTULO I – Introdução Geral .....	10
Referências Bibliográficas.....	20
CAPÍTULO II – Chemical composition and control of <i>Sclerotium rolfsii</i> Sacc by essential oils .....	26
Abstract.....	28
Introduction.....	29
Material and methods.....	30
Results and discussion.....	32
References.....	43
CAPÍTULO III – Óleos essenciais em tratamento de sementes no controle de <i>Sclerotium rolfsii</i> Sacc em feijão-caupi e seu efeito na germinação das sementes	52
Resumo .....	53
Introdução .....	54
Material e métodos .....	56
Resultados e Discussão .....	60
Conclusões .....	70
Referências .....	70
CAPÍTULO IV – Efeito da biofumigação do solo com óleo essencial sobre incidência de <i>Sclerotium rolfsii</i> Saac em feijão-caupi .....	78
Resumo .....	79
Introdução .....	80
Material e métodos .....	81
Resultados e Discussão .....	85
Conclusões .....	94
Referências .....	94
CONCLUSÕES GERAIS .....	101

## RESUMO GERAL

Causada pelo fungo *Sclerotium rolfsii*, a murcha de esclerócio em feijão-caupi tem no controle químico uma opção pouco eficiente, sendo o uso de Óleos Essenciais (OEs) uma alternativa ao controle da doença. Objetivou-se avaliar OEs de plantas nativas da Região Meio-Norte (*Lippia sidoides*, *Lippia lasiocalycina*, *Lippia origanoides*, *Lippia origanoides* - Jatobá, *Mesosphaerum suaveolens*, *Croton sonderianus* e *Croton zehntneri*) na redução de *S. rolfsii* em ensaios *in vitro* e *in vivo*, e caracterizar quimicamente os OEs avaliados. A composição química dos OEs, identificou 73 compostos. Considerando cada espécie, os constituintes majoritários foram timol (*L. sidoides*); óxido de piperitenona (*L. lasiocalycina*); borneol (*L. origanoides*); carvacrol (*L. origanoides* - Jatobá); sabineno (*H. suaveolens*); β-sabineno (*C. sonderianus*); e estragol (*C. zehntneri*). Avaliou-se, inicialmente, a sensibilidade micelial de *S. rolfsii* na presença dos OEs *in vitro* nas concentrações 0,0313; 0,0625; 0,1250; 0,2500 e; 0,500 ml kg<sup>-1</sup> em placas de Petri com meio BDA. O fungo *S. rolfsii* mostrou-se altamente sensível aos OEs de *L. sidoides*, *L. origanoides* – Jatobá e *C. zehntneri*. Identificados os OEs mais promissores, estes foram avaliados a partir do tratamento de sementes e biofumigação. No tratamento de sementes, utilizou-se sementes da cultivar BRS Tumucumaque nas concentrações 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e; 8,0 ml kg<sup>-1</sup> de semente, conduzidos em placas de Petri com meio BDA e em vasos, com solo infestado. O efeito do tratamento sobre a germinação das sementes foi obtido com o teste de germinação padrão com rolo de papel. Todos os óleos reduziram o crescimento micelial de *S. rolfsii* *in vitro*. No tratamento *in vivo*, o emprego do tratamento de sementes com OEs é efetivo na concentração de 4,0 ml kg<sup>-1</sup>. Concentrações maiores, apesar de apresentarem excelentes níveis de controle, interferem negativamente na germinação das sementes. Para avaliar o efeito da biofumigação, utilizou-se óleos nas concentrações 3,18; 6,46; 12,8; 25,62 e; 51,25 μL placa<sup>-1</sup> em diferentes tempos (0; 24; 48 e; 72 h) de biofumigação. Concentrações de 3,18 μL placa<sup>-1</sup> inibiram completamente a germinação de esclerócios nos ensaios *in vitro*. Em vasos, com solo previamente infestado, as concentrações utilizadas foram: 24,4; 48,8; 97,5; 195 e; 390 μL vaso<sup>-1</sup> nos tempos de 0; 24; 48 e; 72 h de biofumigação. A viabilidade dos esclerócios de *S. rolfsii* foi totalmente anulada quando submetidas à biofumigação com todos os OEs avaliados nas concentrações iguais e superiores a 3,18 μl placa<sup>-1</sup>. A murcha de esclerócio é controlada pela biofumigação do solo com todos os OEs testados, sendo o melhor controle obtido com *L. sidoides*.

**Palavras-chave:** Atividade antifúngica; controle alternativo; cromatografia; murcha de esclerócio; *Vigna unguiculata* (L.) Walp.



## GENERAL ABSTRACT

Caused by the fungus *Sclerotium rolfsii*, the sclerotium wilt in cowpea has in chemical control an inefficient option, being the use of Essential Oils (OEs) an alternative to the control of the disease. The objective of this study was to evaluate the OEs of native plants of the Middle North Region (*Lippia sidoides*, *Lippia lasiocalycina*, *Lippia origanoides*, *Lippia origanoides* - Jatobá, *Mesosphaerum suaveolens*, *Croton sonderianus* and *Croton zehntneri*) in reducing *S. rolfsii* in *in vitro* and *in vivo*, and chemically characterize the evaluated OEs. The chemical composition of the OEs identified 73 compounds. Considering each species, the major constituents were thymol (*L. sidoides*); piperitenone oxide (*L. lasiocalycina*); borneol (*L. origanoides*); carvacrol (*L. origanoides* - Jatobá); sabinene (*H. suaveolens*);  $\beta$ -sabinene (*C. sonderianus*); and estragol (*C. zehntneri*). The mycelial sensitivity of *S. rolfsii* in the presence of OEs *in vitro* at concentrations of 0.0313; 0.0625; 0.125; 0.2500 e; 0.500 ml kg<sup>-1</sup> in Petri dishes with PDA medium. The *S. rolfsii* fungus was highly sensitive to the OEs of *L. sidoides*, *L. origanoides* - Jatobá and *C. zehntneri*. Identifying the most promising OEs, these were evaluated from seed treatment and biofumigation. In the treatment of seeds, seeds of the cultivar BRS Tumucumaque were used in concentrations 0.5; 1.0; 2.0; 4.0 e; 8.0 ml kg<sup>-1</sup> of seed, conducted in Petri dishes with PDA medium and in pots, with infested soil. The effect of the treatment on the germination of the seeds was obtained with the standard germination test with paper roll. All oils reduced the mycelial growth of *S. rolfsii in vitro*. *In vivo* treatment, the use of seed treatment with OEs is effective at the concentration of 4.0 ml kg<sup>-1</sup>. Larger concentrations, despite having excellent levels of control, negatively interfere with seed germination. To evaluate the effect of biofumigation, oils were used at concentrations 3.18; 6.46; 12.8; 25.62 and; 51.25  $\mu\text{L plate}^{-1}$  at different times (0; 24; 48 and; 72 h) of biofumigation. Concentrations of 3.18  $\mu\text{L plaque}^{-1}$  completely inhibited sclerotia germination *in vitro* assays. In pots, with previously infested soil, the concentrations used were: 24.4; 48.8; 97.5; 195 e; 390  $\mu\text{l pot}^{-1}$  at times of 0; 24; 48 e; 72 hours of biofumigation. The viability of *S. rolfsii* sclerotia was completely annulled when submitted to biofumigation with all OEs evaluated at concentrations equal to and greater than 3.18  $\mu\text{l plate}^{-1}$ . Sclerotium wilt is controlled by soil biofumigation with all OEs tested, being the best control obtained with *L. sidoides*.

**Key words:** Antifungal activity; alternative control; chromatography; sclerotium wilt; *Vigna unguiculata* (L.) Walp.

## **Capítulo I**

---

### **Introdução Geral**

# ACÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS NO CONTROLE DE *Sclerotium rolfsii* Sacc. EM FEIJÃO-CAUPI

## INTRODUÇÃO GERAL

### 1. Aspectos gerais da cultura do feijão caupi

O feijão-caupi é uma espécie vegetal de origem africana e foi introduzido na América Latina, no século XVI pelos colonizadores espanhóis e portugueses. Sua entrada no Brasil ocorreu, provavelmente, no estado da Bahia, se expandindo, por todo país, principalmente para os estados do Nordeste (FREIRE FILHO et al., 2011). Também conhecida como feijão-da-estrada, feijão-de-praia, feijão-de-rama, feijão-fradinho, feijão macassar, feijão-de-corda, macáçar ou macaça é uma planta *Dicotyledonea*, que pertence à ordem *Fabales*, família *Fabaceae*, subfamília *Faboideae*, tribo *Phaseoleae*, subtribo *Phaseolinae*, gênero *Vigna*, subgênero *Vigna*, secção *Catiang*, espécie *Vigna unguiculata* (L.) Walp (FREIRE FILHO et al., 2005).

É uma planta herbácea, anual, de crescimento determinado ou indeteminado, com hábitos de crescimento ereto, semi-ereto, prostados, semi-prostados ou trepadores. A germinação é epígea e a raiz pivotante que a planta desenvolve pode chegar a mais de um metro de profundidade, apresenta raízes laterais bastante profusas que permitem explorar um bom volume de solo (FALL et al., 2003).

O feijão-caupi desenvolve-se em solos com regular teor de matéria orgânica, soltos, leves, profundos e arejados. Segundo Oliveira (1998) quanto maior o teor de areia no solo, mais as raízes se aprofundam e melhor é o desenvolvimento das plantas. O fato de o feijoeiro fixar o nitrogênio da atmosfera, por meio da simbiose com bactérias do gênero *Rhizobium*, é garantia de um melhor desenvolvimento vegetativo e produtivo, contribuindo para redução do uso de fertilizantes nitrogenados (MELO et al., 2003).

A espécie apresenta importante papel na dieta humana, sendo uma das principais fontes de proteínas das famílias, principalmente das regiões norte e nordeste do Brasil, onde é consumida na forma de grãos verdes ou secos (NEVES et al., 2011), além de ser fonte geradora de emprego e renda (TEÓFILO et al., 2008; FREIRE FILHO et al., 2011).

O feijão-caupi é cultivado em diversos países localizados nas regiões semiáridas do mundo. No Brasil, vem sendo cultivado em todas as regiões, em maior ou menor escala. É considerada uma planta adaptada às condições edafoclimáticas da região nordeste em virtude

de possuir tolerância a altas temperaturas, a períodos de estiagem (veranicos) e apresentar ciclo curto. Segundo Oliveira et al. (2002), é amplamente cultivada nas áreas irrigadas do Nordeste. É considerada uma cultura com grande importância socioeconômica por fixar a mão-de-obra no campo (BASTOS et al., 2012).

De acordo com dados da Embrapa Arroz e Feijão (2018) foram produzidas 344.752 toneladas de feijão-caupi no Brasil no ano de 2016, sendo 177.527 t produzidas na região nordeste e 134.814 t na região centro-oeste, mostrando que o seu cultivo não se restringe às regiões norte e nordeste e, segundo Freire Filho et al. (2011), a cultura do feijão-caupi ganhou espaço na região centro-oeste, inicialmente cultivada na safrinha, a cultura tem ganhado atenção entre os grandes produtores dessa região. Ainda segundo dados da Embrapa Arroz e Feijão (2018), os principais produtores de feijão-caupi são, em ordem de produção, os estados do Mato Grosso (134.814t), Ceará (55.278t), Maranhão (34.934t), Pernambuco (25.153t) e Piauí (21.959t).

Um dos aspectos que contribuiu e foi crucial para o avanço da cultura do feijão-caupi na região Centro-Oeste foi o lançamento de cultivares que agregam características importantes para o cultivo em grandes áreas, dentre elas, citam-se porte mais ereto da planta, que possibilita colheita mecânica, alta produtividade, resistência a fitopatógenos, baixo acamamento da planta, aumento do peso de 100 grãos, bem como a redução do ciclo de maturação da planta.

## **2. Doenças do feijão-caupi**

Apesar de sua importância e lançamento de cultivares modernas, a cultura ainda apresenta baixos rendimentos (MORAES, 2007). A ação de fatores bióticos e abióticos interfere diretamente na produção de feijão-caupi. Entre essas limitações, pode-se destacar o baixo uso de tecnologia, principalmente em relação aos insumos, onde o agricultor utilizando-se de grãos, como sementes e sem tratamento adequado, contribui para o surgimento de doenças (RODRIGUES; MENEZES, 2002).

Dentre os agentes patogênicos que podem incidir na cultura do feijão-caupi e provocar perdas na qualidade e no rendimento dos grãos estão fungos, bactérias, vírus e nematoides. Devido às condições climáticas do Brasil, perdas em áreas de cultivo de feijão-caupi por doenças causadas por fungos, podem alcançar um patamar elevado, principalmente onde se emprega baixa tecnologia fitossanitária no cultivo desta leguminosa (POLTRONIERI; TRINDADE; SILVA, 1994).

Entre os fungos fitopatogênicos, existe uma diversidade de espécies que causam perdas na produção e produtividade do feijão-caupi, estas podem causar diferentes doenças, podendo colonizar distintos tecidos e sobreviver em habitats diversificados (ATHAYDE SOBRINHO;

VIANA; SANTOS, 2005). As doenças de causas fúngicas de parte aérea mais relacionadas ao feijão-caupi são as cercoporioses ocasionadas pelas espécies *Mycosphaerella cruenta* Latham [*Pseudocercospora cruenta* (Sacc.) Deighton] e *Cercospora canescens* Ellis e G. Martin; a ferrugem causada por *Uromyces appendiculatus* (Pers.) Unger; a antracnose ocasionada por *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magnus) Briosi e Cavara e a mancha-café causada por *Colletotrichum truncatum* (Schewin.) Andrus e Moore (ADEGBITE; AMUSA, 2005; PIO-RIBEIRO; ASSIS FILHO; ANDRADE, 2005; SINGH; ALLEN, 1979).

O grupo de fungos fitopatogênicos habitantes do solo responsável por grandes perdas no feijão caupi é representado principalmente pelas espécies: *Fusarium oxysporum* f.sp. *tracheiphilum* (E. F. Smith) Snyder & Hansen, causadora da murcha de fusário; *Macrophomina phaseolina* (Tassi.) Goid., causadora da podridão cinzenta do caule; *Rhizoctonia solani* Kühn., agente causal da mela e de podridões de raiz e caule; *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., causador da podridão das raízes; *Pythium aphanidermatum* (Eds.) Fitzp., causador da podridão do colo e *Sclerotium rolfsii* Sacc., o causador da podridão ou murcha de esclerócio (ADEGBITE; AMUSA, 2005; ATHAYDE SOBRINHO; VIANA; SANTOS, 2005; MICHEREFF et al., 2005; PIO-RIBEIRO; ASSIS FILHO; ANDRADE, 2005; SINGH; ALLEN, 1979).

## 2.1. Murcha de esclerócio em feijão-caupi

Dentre os agentes patogênicos que podem incidir a cultura do feijão-caupi, o fungo *Sclerotium rolfsii* Sacc. causa a murcha de esclerócio. A doença ocorre na maioria das áreas produtoras do Nordeste. Em feijão comum, a podridão do colo pode provocar perdas de 5% na produção anual no Sul dos Estados Unidos, mas no Brasil desconhece-se a magnitude destas perdas (PAZ-LIMA et al., 2015).

As perdas ocasionadas por este patógeno vêm crescendo em grande intensidade nas lavouras de feijão-caupi em algumas regiões do Brasil, sendo considerada uma ameaça potencial (ATHAYDE SOBRINHO; VIANA; SANTOS, 2005). O modo de proliferação e persistência de *S. rolfsii* no solo, além de sua diversificada gama de hospedeiros, cerca de 500 espécies botânicas (MAFIA et al., 2007) a maioria dicotiledôneas (ADANDONON et al., 2006), contribui para grandes perdas econômicas na agricultura (SINGH; ALLEN, 1979).

O fungo *S. rolfsii* foi descrito pela primeira vez por Saccardo em 1913 (SINGH; SARMA, 2009), no entanto, os primeiros trabalhos, relatando esta espécie como fitopatógeno, foram realizados anteriormente por Rolfsii em 1892, que utilizou em suas pesquisas plantas de tomate (*Solanum lycopersicon* L.) como hospedeiras no estado da Carolina do Norte, Estados

Unidos da América (TAUBENHAUS, 1919).

O fungo *S. rolfii* foi classificado taxonomicamente como pertencente à classe Agaricomycetes (MASSOLA JÚNIOR; KRUGNER, 2011); ordem Atheliales (XU et al., 2010); família Atheliaceae (MYCOBANK, 2018). Sua fase teleomorfa (sexual/perfeita) sofreu várias mudanças taxonômicas, ao passar do tempo, descrita primeiramente como *Corticium centrifungum* (Lev.). Bres. e depois mudada para *Corticium rolfii* Curzi. Posteriormente, a espécie foi alocada dentro do gênero *Pellicularia*, em seguida no gênero *Botryobasidium* (SINGH; SARMA, 2009).

A fase teleomórfica foi denominada de *Athelia rolfii* (Curzi) (Tu & Kimbrough (AGRIOS, 2005; SINGH; SARMA, 2009; XU et al., 2010; MASSOLA JÚNIOR; KRUGNER, 2011; INDEX FUNGORUM, 2018). Esta fase é raramente observada na natureza (AGRIOS, 2005) e, provavelmente, não possui importância primária na transmissão da doença (MORDUE, 1974). Em condições experimentais, a indução da fase teleomórfica é dependente do isolado em questão, da disponibilidade de nutrientes no meio de cultura para crescimento, da intensidade de luz e idade da colônia fúngica (PUNJA, 1985; SINGH; SARMA, 2009).

Morfologicamente, *S. rolfii* é caracterizado pela formação de hifas estéreis, de coloração branca, septadas, intensamente ramificadas e de aspecto cotonoso. Durante seu desenvolvimento, o fungo pode apresentar a formação abundante de esclerócios (SINGH; ALLEN, 1979; AGRIOS, 2005; MASSOLA JÚNIOR; KRUGNER, 2011), sendo estas estruturas constituídas por agregados compactos de hifas somáticas, que formam massas arredondadas ou de formato irregular (SURHONE; TENNOE; HENSSONOW, 2011).

Na espécie *S. rolfii*, os esclerócios são conspícuos, com 0,5-3 mm de diâmetro (SINGH; SARMA, 2009; MASSOLA JÚNIOR; KRUGNER, 2011), sendo considerados estruturas de resistência do patógeno, e, dependendo das condições ambientais, podem persistir no solo durante anos (PUNJA, 1985; MASSOLA JÚNIOR; KRUGNER, 2011). A formação e extensão do micélio do patógeno a partir destes esclerócios no solo são influenciadas pela forma de germinação dos mesmos, pela presença de compostos voláteis, tecidos de plantas hospedeiras e nutrientes solúveis no solo (PUNJA; JENKINS; GROGAN, 1984), além da presença de outros substratos orgânicos disponíveis (BEUTE; KABANA, 1981; SINGH; SARMA, 2009).

Regiões de clima tropical, caracterizadas por elevada umidade do ar e temperaturas altas são mais propícias para o desenvolvimento de doenças ocasionadas por *S. rolfii* (BEUTE; KABANA, 1981; ADANDONON, 2004). Conseqüentemente, estas doenças são mais comuns em áreas de plantio que se localizam em latitudes inferiores a 38° (AGRIOS, 2005), em regiões tropicais e subtropicais (PUNJA, 1985; PAZ-LIMA et al., 2015). A temperatura ótima para o

crescimento de *S. rolfsii* varia de 27 a 30°C e os esclerócios não sobrevivem em temperaturas abaixo de 0°C. Este requerimento limita a distribuição do patógeno a regiões com temperaturas amenas (PUNJA; RAHE, 1992).

O fungo *S. rolfsii* é um agente causal pertencente ao grupo das doenças denominadas de podridões de raízes e colo (BEDENDO, 2011). Em plantas de feijão-caupi, os sintomas típicos da podridão ou murcha-de-esclerócio são o amarelecimento de folhas e murcha da planta (NECHET; VIEIRA, 2006). Inicialmente ocorrem lesões marrons e aquosas sobre a região do colo da planta. Estas lesões avançam, produzindo escurecimento e podridão, resultando em destruição do córtex caulinar e da raiz principal. Os sintomas reflexos ocorrem na parte aérea da planta, na forma de amarelecimento das folhas baixas, seguindo em direção às folhas superiores. As plantas, severamente afetadas têm o colo colapsado, o que provoca murcha da parte aérea, seca, queda de folhas e morte. Em condições de alta umidade, surge o crescimento micelial branco sobre o colo da planta e superfície do solo. Sobre este micélio vigoroso formam-se esclerócios esféricos, inicialmente brancos e posteriormente escuros. Plântulas em emergência também podem ser afetadas, provocando redução do estande (KIMATI et al., 2011).

### **3. Controle da murcha de esclerócio**

O controle de doenças radiculares tem se tornado muito difícil, devido à coevolução patógeno-planta por milhões de anos, estando o patógeno altamente adaptado ao ambiente subterrâneo em associação com o hospedeiro (MICHEREFF et al., 2005).

Dentre as várias formas de manejo visando o controle de doenças ocasionadas por *S. rolfsii*, podem ser relatados o uso de cultivares resistentes (ADANDONON et al., 2006; SILVA et al., 2014); uso de fungicidas químicos (PUNJA, 1985; SALES JÚNIOR et al., 2005; ATHAYDE SOBRINHO; VIANA; SANTOS, 2005; BEDENDO, 2011); práticas culturais que envolvem rotação de culturas (BEDENDO, 2011); utilização de microrganismos biocontroladores (PUNJA, 1985; SINGH et al., 2002; ADANDONON et al., 2006; AULER; CARVALHO; MELLO, 2013); e o uso de produtos alternativos a base de extratos e óleos vegetais (SANTOS; TOMAZELI; MORALES, 2009).

O controle genético de doenças ocasionadas por *S. rolfsii* através de materiais resistentes é dificultado devido à natureza agressiva do patógeno, aliada à falta de especificidade em relação ao hospedeiro, o que impede a obtenção de materiais com bons níveis de resistência à doença (BEDENDO, 2011), além de que os métodos de triagens existentes em pesquisas,

visando à resistência genética a murcha ou podridão de esclerócio em feijão caupi, não estão bem estabelecidos (ADANDONON, 2004). Silva et al. (2014) ao avaliarem genótipos de feijão-fava a diferentes isolados de *S. rolf sii* verificaram a existência de materiais com potencial de utilização no manejo da podridão do colo. Estudos direcionados a obtenção de cultivares de feijão-caupi, resistentes a *S. rolf sii*, vem sendo realizados na América do Norte, apresentando resultados promissores em cruzamentos envolvendo as cultivares “Carolina Cream” e “Brown Crowder”, criando desta forma, boas expectativas no controle genético para o manejo da doença (FERY; DUKES, 2011).

O controle químico de doenças de plantas é ainda bastante praticado em todo o mundo, mas ao longo dos anos, surgiram diversos problemas, como resistências dos fitopatógenos, contaminação ambiental e danos à saúde da população (MELO, 1998; SCHWAN-ESTRADA et al., 2000; MORANDI; BETTIOL, 2009).

Moléculas químicas de diversos produtos foram estudadas e relatadas no controle do patógeno, a exemplo do quintozene (pentacloronitrobenzeno-PCNB) (PUNJA, 1985; SALES JÚNIOR et al., 2005), captafol e dicloran (PUNJA, 1985). Apesar do uso de fungicidas para o controle de *S. rolf sii* em áreas de cultivo, o banco de dados defensivos agrícolas do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) oferece apenas um ingrediente ativo de fungicidas recomendados para a cultura do feijão-caupi (AGROFIT, 2018).

O aumento de doenças de plantas causadas por fitopatógenos habitantes do solo em áreas de cultivo pode indicar a ocorrência de um desequilíbrio biológico, já que em sistemas naturais existe uma alta taxa de mortalidade destes fitopatógenos devido a diversos mecanismos naturais supressivos existentes no solo (BETTIOL; GHINI, 2005). Os problemas decorrentes de algumas práticas agrícolas, a exemplo do uso intensivo de defensivos agrícolas no controle de microrganismos fitopatogênicos, têm causado desequilíbrios biológicos nos agroecossistemas e alterado o cenário agrícola, resultando na busca de segmentos diferenciados e práticas mais sustentáveis ao meio ambiente (MORANDI et al., 2009). Estes segmentos visam alterar as prioridades dos sistemas convencionas de agricultura em relação ao uso de fontes não renováveis, reduzindo a dependência por produtos químicos e outros insumos poluentes ao meio ambiente, dando mais atenção ao uso de processos biológicos nos sistemas agrícolas (BETTIOL, 2010). Nesse contexto, o controle biológico de microrganismos fitopatogênicos torna-se importante e justificável (MORANDI et al., 2009).

Uma outra ferramenta que pode ser empregada no manejo da murcha de esclerócio é o controle biológico do fitopatógeno, cujo conceito original, definido pelo grupo inglês denominado “Federation of British Plant Pathologists”, em 1973, consiste no emprego de



inimigos naturais ou antagonísticos para o controle de fitopatógenos (ROBBS, 1991). Outro conceito mais abrangente foi apresentado por Cook e Baker (1983), que definiram o controle biológico como a redução da soma de inóculo ou das atividades determinantes da doença provocada por um patógeno, realizada por um ou mais organismos que não o homem. Alguns microrganismos apresentam bom potencial biocontrolador para interferir nos processos vitais de fitopatógenos diretamente ou indiretamente, neste segundo caso, através da indução de resistência a estes fitopatógenos em plantas hospedeiras (MORANDI et al., 2009).

Os mecanismos de antagonismo podem atuar diretamente sobre o patógeno são: o parasitismo, competição, predação, estímulo à germinação seguida de exaustão e lise de propágulos, diminuição das reservas energéticas e antibiose (amensalismo) em fitopatógenos (WHIPPS, 2001; BETTIOL; GHINI, 2005). No controle biológico de doenças ocasionadas por *S. rolfisii*, algumas bactérias são objeto de estudo como agentes biocontroladoras em potencial, como *Pseudomonas* spp. (PUNJA, 1985; PUNJA, 1997) e *Bacillus subtilis* (Erhenberg) Cohn. (PUNJA, 1997; ANDANDONON et al., 2006). Espécies do gênero *Trichoderma*, por exemplo, são consideradas eficientes antagonistas contra uma série de fungos fitopatogênicos (BROTMAN; GUPTA; VITERBO, 2010). São habitantes naturais do solo de clima temperado e tropical, podem viver saprofiticamente ou parasitando outros fungos (HARMAN et al., 2004). Sua ação ocorre por meio da associação ou não dos mecanismos de parasitismo, antibiose, competição por nutrientes e substratos (CARVALHO et al., 2011).

Em relação ao controle biológico deste fitopatógeno através de leveduras, poucos trabalhos têm sido mencionados em literaturas existentes, incluindo poucos relatos com *Saccharomyces cerevisiae* (Meyer) Hansen como agente biocontroladora, resumindo-se em ensaios *in vitro* (SHALABY; EL NADY, 2008). Contudo, em patossistema envolvendo feijão caupi e *S. rolfisii*, trabalhos relevantes são pouco divulgados ou inexistentes quando comparados ao uso de bactérias e fungos filamentosos antagonistas no controle biológico deste mesmo grupo de fitopatógeno (EL TARABILY; SIVASITHAMPARAM, 2006, SCHISLER et al., 2011).

A retomada dos conceitos de saúde aliada à utilização correta do meio ambiente estimulou a utilização de métodos alternativos de controle que possam ser utilizados de forma integrada para reduzir o impacto ambiental deixado pelos produtos químicos (KNAAK; FIÚZA, 2010). A substituição de agroquímicos por substâncias extraídas de plantas com ação fungicida vem sendo pesquisada no meio agrícola. Diversos trabalhos vêm demonstrando a eficiência de óleos essenciais e extratos vegetais na inibição de fungos fitopatogênicos (AMARAL; BARA, 2005; SPECIAN et al., 2015).

### 3.1 Controle alternativo com óleo essencial

Os óleos essenciais são, de acordo com Bakkali et al. (2008), compostos complexos, naturais, voláteis, caracterizados por um forte odor. Podem ser sintetizados por todos os órgãos das plantas: flores, folhas, caules, galhos, sementes, frutas, raízes, madeira e cascas. Na natureza, eles desempenham um papel importante na proteção das plantas como antibacterianos, antivirais, antifúngicos e inseticidas. Esses óleos podem ser formados por cem ou mais compostos orgânicos, sendo os monoterpenos e sesquiterpenos os compostos encontrados com maior frequência (CASTRO et al., 2004; CASTRO et al., 2010).

A atividade biológica dos óleos essenciais e de seus constituintes pode ser verificada como agentes fungistáticos e/ou fungicidas, dependendo das concentrações utilizadas. O mesmo óleo pode ser ativo contra um amplo espectro de espécies de microrganismos, porém as concentrações mínimas inibitórias (CMI) podem variar (ANTUNES; CAVACOB, 2010).

Apesar dos mecanismos de ação desses compostos serem pouco caracterizados, a maioria deles parece estar associada ao caráter lipofílico (BAKKALI et al., 2008) de seus constituintes, havendo um acúmulo em membranas e perda de energia pelas células microbianas (KNAAK; FIÚZA, 2010). A hidrofobicidade do óleo essencial permite uma interação entre o óleo e os lipídeos da membrana celular, interferindo na sua permeabilidade e causando alterações em sua estrutura (COSTA et al., 2011), uma vez que determinados terpenos presentes nos extratos vegetais são capazes de tornar a membrana celular do fungo permeável, causando o extravazamento de seu conteúdo (KNAAK; FIÚZA, 2010).

Rasooli et al. (2006), por meio de microscopia eletrônica de varredura, observaram que a parede, membrana e organelas celulares do fungo *Aspergillus niger* mostravam graves danos quando exposto a concentrações mínimas inibitórias dos óleos essenciais de *Thymus eriocalyx* e *T. x-porlock*. O micélio do patógeno apresentou alterações morfológicas nas hifas, interrupção e destruição das membranas plasmáticas e mitocondriais. Costa et al. (2011) avaliando o efeito do óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L. M. Perry) sobre o fungo *Rizoctonia solani*, observaram diferentes alterações morfológicas nas hifas, sendo evidentes a presença de vacúolos e desorganização dos conteúdos celulares, diminuição na nitidez da parede celular, intensa fragmentação das hifas, além de menor turgência das mesmas podendo ser considerado um indicativo de degeneração celular. A utilização de técnicas utilizando produtos alternativos à base de extratos de plantas para o controle de fitopatógenos ainda é restrita, sendo uma prática que apresenta diferentes linhas de abordagens quanto à forma

de trabalho, tanto na padronização de testes a serem utilizados, bem como na obtenção e controle da qualidade final destes produtos (SILVA et al., 2010).

Ao investigar a ação do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* sobre o crescimento de *F. oxysporum*, *F. solani*, *M. phaseolina* e *R. solani*, Costa et al., (2011) utilizaram frascos de vidro de 10 mL, previamente esterilizados contendo 3 mL de caldo Sabouraud 2% e o óleo essencial à 0,15%. Nestes frascos foram depositados discos de 5 mm de diâmetro da colônia jovem desses fungos e após 12 horas de incubação, os discos foram levados ao microscópio óptico, para análise das alterações celulares das hifas. Aquino et al. (2014) avaliando a atividade de diferentes óleos essenciais sobre *Colletotrichum gloeosporioides* do maracujazeiro, *in vitro*, acrescentou 1 mL de cada concentração em 19 mL de meio BDA fundente, resfriado até 45 °C. Posteriormente, transferiu-se um disco de 5 mm de diâmetro da cultura monospórica para o centro de cada placa. As laterais das placas foram vedadas com filme de PVC para evitar possível evaporação dos compostos e ressecamento do meio de cultura. A avaliação constituiu-se de medições diárias do diâmetro das colônias em dois eixos ortogonais (longitudinal e transversal), a qual iniciou-se 48 horas após a repicagem do fungo para cada placa.

Nos relatos científicos há registros da eficiência de óleos vegetais obtidos de uma enorme gama de espécies botânicas em promover a inibição do desenvolvimento de vários fitopatógenos de natureza fúngica (KNAAK; FIÚZA, 2010; LEE et al., 2008). Avaliando o efeito de óleos essenciais das espécies *Baccharis dracunculifolia* (alecrim-do-campo), *Schinus terebinthifolius* (aroeirinha) e *Porophyllum ruderale* (arnica-brasileira) sobre o crescimento dos fungos fitopatogênicos *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, *F. solani* f. sp. *phaseoli*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *S. minor*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* e *Macrophomina phaseolina* Fonseca et al. (2015) observaram que todos os óleos possuem potencial para o controle dos fungos fitopatogênicos estudados, com destaque para o óleo de alecrim-do-campo.

O nordeste brasileiro é detentor de uma ampla biodiversidade, com várias espécies botânicas espalhadas em vários ecossistemas. O gênero *Lippia* é composto por cerca de 200 espécies de ervas, arbustos e pequenas árvores pertencentes à família Verbenaceae. Entre as principais espécies deste gênero estão: *Lippia gracilis* Schauer.; *Lippia sidoides* Cham.; *Lippia alba* Mill N.E. Brown.; *Lippia microphylla* Cham.; *Lippia graveolens* Kunth.; *Lippia alnifolia* Mart. & Schauer.; *Lippia aristata* Schau.; *Lippia grata* Schau.; *Lippia triphylla* (L' Hér.) Britt.); *Lippia thymoides* Martius and Schau.; *Lippia citiodora* Kunth.; *Lippia adoensis* Hochst e *Lippia schimperi* Wolp.(TERBLANCHÉ; KORNELIUS, 1996), sendo caracterizadas pela presença de óleos essenciais com atividade antimicrobiana e pela presença de compostos como timol e carvacrol, os quais apresentam propriedades antisséptica, antimicrobiana, antifúngica,

antioxidante, anti-inflamatória e larvicida (ALMEIDA et al., 2010).

A espécie *L. sidoides* Cham., conhecida popularmente como alecrim-pimenta, é uma planta aromática encontrada no sertão nordestino, principalmente nos estados do Ceará e Rio Grande do Norte (GARMUS et al., 2015). Trata-se de um arbusto densamente ramificado, nativo do semiárido nordestino, de até três metros de altura, com ramos providos de folhas pecioladas e simples, de dois a três centímetros, muito aromáticas e picantes. As flores são pequenas, esbranquiçadas, reunidas em espigas de eixo curto nas axilas das folhas. Sua propagação é assexuada, através do processo de estaquia, usando os ramos mais finos (LORENZI; MATOS, 2002) ou estacas herbáceas com folhas (MENDONÇA, 1997).

Devido seu uso na medicina popular como antisséptico e antimicrobiano, o alecrim-pimenta destaca-se como uma espécie que teve o cultivo ampliado em vários estados brasileiros, pela inclusão em programas de fitoterapia (COSTA et al., 2002), estando, inclusive, listada na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde, a RENISUS (CARVALHO JUNIOR et al., 2011). Carvalho et al. (2013) utilizando óleo de *L. sidoides* e *L. gracilis* conseguiram inibir o crescimento de *Thielaviopsis paradoxa*, agente causal da resinose do coqueiro, através do timol e carvacrol, principais componentes químicos com ação fungicida.

Ao testar óleos essenciais sobre *Colletotrichum gloeosporioides* do maracujazeiro, Aquino et al. (2014) conseguiram visualizar em baixas dosagens, efeito fungitóxico e fungistático para *L. sidoides*., *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf.) e *Ocimum gratissimum* L. Em pós colheita, Lorenzetti et al., (2011) identificaram em óleos essenciais de capim-limão, palmarosa, citronela, cravo, canela, menta, lavanda, tangerina, eucalipto, melaleuca, alecrim e laranja, componentes oriundos do metabolismo secundário de plantas, que exercem efeito no controle do mofo cinzento em morangueiro, causado por *Botrytis cinerea*, justificando o uso de óleo essencial no controle de fitopatógenos

Diante disso, objetivou-se (i) : identificar plantas nativas produtoras de óleo essencial com potencial bioatividade sobre *S. rolfsii* , (ii) obter o óleo dessas plantas e listar seus constituintes, bem com quantificá-los, (iii) avaliar o potencial efeito *in vitro* dos óleos coletados sobre *S. rolfsii*, (iv) verificar as formas eficazes de utilização *in vivo* dos óleos via tratamento de sementes, e via fumigação do solo no controle da murcha de esclerócio, bem como o efeito dos mesmos sobre a germinação das sementes. Estas informações fornecerão importantes informações sobre o patossistema *S. Rolfsii* – feijão-caupi com as quais espera-se auxiliar no manejo sustentável da murcha de esclerócio visando a redução da ocorrência da doença no campo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADANDONON, A. **Damping-off and stem rot of cowpea in Benin caused by *Sclerotium rolfsii***. 2004. 154 f. Tese (Doutorado em Microbiologia e Patologia de Plantas) – Universidade de Pretoria, Pretoria. 2004

ADANDONON, A.; AVELING, T. A. S.; LABUSCHAGNE, N.; TAMO, M. Biocontrol agents in combination with *Moringa oleifera* extract for integrated control of *Sclerotium* caused cowpea damping-off and stem rot. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 115, n. 4, p. 409-418, 2006.

ADEGBITE, A. A.; AMUSA, N. A. The major economic field diseases of cowpea in humid agro-ecologies of Southwestern Nigeria. **African Journal Biotechnology**. Nairóbi, v. 25, p. 4706-4712. 2005.

AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5.ed. San Diego: Academic Press, 2005. 635.p.

AGROFIT – MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUARÁRIA E ABASTECIMENTO. **MAPA 2012**: Sistema de agrotóxicos fitossanitários [on line]. Brasília: Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento, 2018. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/agrotoxicos> > Acesso em: 10 out. 2018.

ALMEIDA, M. C. S. de; ALVES, L. A.; SOUZA, L. G. da S.; MACHADO, L. L.; MATOS, M. C. de; OLIVEIRA, M. C. F. de; LEMOS, T. L. G.; BRAZ-FILHO, R. Flavonoides e outras substâncias de *Lippia sidoides* e suas atividades antioxidantes. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 9, p. 1877- 1881, 2010.

AMARAL, M. F. Z. J.; BARA, M. T. F. Avaliação da atividade antifúngica de extratos de plantas sobre o crescimento de fitopatógenos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, Goiânia, v. 2, p. 5-8. 2005.

ANTUNES, M. D. C.; CAVACOB, A.; The use of essential oils for postharvest decay control. A review. **Flavour and Fragrance Journal**, Chichester. v. 25, p. 351-366, 2010.

AQUINO, C. F.; SALES, N. L. P.; SOARES, E. P. S.; MARTINS, E.R.; COSTA, C. A. Composição química e atividade in vitro de três óleos essenciais sobre *Colletotrichum gloeosporioides* do maracujazeiro. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.16, n.2, supl. I, p.329-336, 2014.

ATHAYDE SOBRINHO, C.; VIANA, F. M. P.; SANTOS, A. A. dos. Doenças fúngicas e bacterianas. In: FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. de A.; RIBEIRO, V. Q. (Ed.). **Feijão-caupi**: avanços tecnológicos. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2005. Cap. 12, p. 461-484.

AULER, A. C. V.; CARVALHO, D. D. C.; DE MELLO, S. C. M. Antagonismo de *Trichoderma harzianum* a *Sclerotium rolfsii* nas culturas do feijoeiro e soja. **Revista Agro@mbiente On-line**, Boa Vista. v. 7, n. 3, p. 359-365, 2013.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, p. 446-475, 2008.

BASTOS, E. A.; RAMOS, H. M. M.; ANDRADE JÚNIOR, A. S.; NASCIMENTO, F. N.; CARDOSO, M. J. Parâmetros fisiológicos e produtividade de grãos verdes do feijão-caupi sob déficit hídrico. **Water Resources and Irrigation Management**, Cruz das Almas, v. 1, n.

1, p.31-37, 2012.

BEDENDO, I. P. Podridões de raiz e colo. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIM FILHO, A. **Manual de fitopatologia**. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2011, v. 1, cap. 23, p. 443-449.

BETTIOL, W. Conversão de sistemas de produção: uma visão global. In: VENZON, M.; PAULA JÚNIOR, T. J.; PALLINI, A. **Controle alternativo de pragas e doenças na agricultura orgânica**. Viçosa: Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais-Zona da Mata, 2010, cap.1, p. 1-24.

BETTIOL, W.; GHINI, R. Solos supressivos. In: MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T.; MENEZES, M. **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2005. p. 125-152.

BEUTE, M. K.; KABANA, R. R. Effects of soil moisture, temperature, and environmental on survival of *Sclerotium rolfsii* in Alabama and North Carolina. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 71, n. 12, p. 1293-1296, 1981.

BROTMAN, Y.; GUPTA, K. J.; VITERBO, A. *Trichoderma*. **Current Biology**, London, v. 20, p. 390-391, 2010

CARVALHO JUNIOR, W. G. O.; MELO, M. T. P.; MARTINS, E. R. Fenologia do alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) em área de Cerrado, no norte de Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 13, n. 2, 2011.

CARVALHO, D. D.; MELLO, S. C. M.; LOBO JUNIOR, M.; GERALDINE, A. M. Biocontrol of seed pathogens and growth promotion of common bean seedlings by *Trichoderma harzianum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46, n. 8, p. 822-828, 2011

CARVALHO, R. R. C.; LARANJEIRA, D.; CARVALHO FILHO, J. L. S.; SOUZA, P. E.; BLANK, A. F.; ALVES, P. B.; JESUS, H. C. R.; WARWICK, D. R. N. In vitro activity of essential oils of *Lippia sidoides* and *Lippia gracilis* and their major chemical components against *Thielaviopsis paradoxa*, causal agent of stem bleeding in coconut palms. **Química Nova**, São Paulo, v. 36, n. 2, p. 241-244, 2013.

CASTRO, H. G.; OLIVEIRA, L. O.; BARBOSA, L. C. A.; FERREIRA, F. A.; SILVA, D. J. H.; MOSQUIM, P. R.; NASCIMENTO, E. A. Teor e composição do óleo essencial de cinco acessos de mentrasto. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 1, p. 55-57, 2004.

CASTRO, H. G.; PERINI, V. B. M.; SANTOS, G. R.; LEAL, T. C. A. B. Avaliação do teor e composição do óleo essencial de *Cymbopogon nardus* (L.) em diferentes épocas de colheita. **Revista Ciência Agrônômica**, Fortaleza, v. 41, n. 2, p. 308-314, 2010.

COOK, R. J.; BAKER, K. F. **The nature and practice of biological control of plant pathogens**. 2. ed. Saint Paul: The American Phytopathological Society. 1983. 539 p.

COSTA, A. R. T.; AMARAL, M. F. Z. J.; MARTINS, P. M.; PAULA, J. A. M.; FIUZA, T. S.; RESVENZOL, L. M. F.; PAULA, J. R.; BARA, M. T. F. Ação do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M. Perry sobre as hifas de alguns fungos fitopatogênicos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 13, n. 2, p. 240-245, 2011.

COSTA, S. M. O.; LEMOS, T. L. G.; PESSOA, O. D. L.; ASSUNÇÃO, J. C. C.; BRAZ-FILHO, R. Constituintes químicos de *Lippia sidoides* (Cham.) Verbenaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 12, p. 66-67, 2002.

EL TARABILY, K. A.; SIVASITHAMPARAM, K. Potential of yeast as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and plant growth promoters. **Mycoscience**, Tokyo, v. 47, p. 25-35. 2006.

EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO. **Dados de conjuntura da produção de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) e caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) no Brasil (1985 a 2017)**.

Santo Antônio de Goiás, 2018. Disponível em:

<<http://www.cnpaf.embrapa.br/socioeconomia/index.htm>>. Acesso em: 01 abr. 20189.

FALL, L.; DIOUF, D.; FALL-NDIAYE, M. A.; BADIANE, F. A.; GUEYE, M. Genetic diversity in cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] varieties determined by ARA and RAPD techniques. **African Journal of Biotechnology**. Nigéria. v. 2, p. 48-50. 2003.

FERY, R. L.; DUKES, P. D. Southern blight (*Sclerotium rolfsii* Sacc.) of cowpea: genetic characterization of two sources of resistance. **International Journal of Agronomy**, v. 6, p. 1-6. 2011.

FONSECA, M.; LEHNER, M.; GONÇALVES, M.; PAULA JÚNIOR, T. J.; SILVA, A.; BONFIM, F.; PRADO, A. Potential of essential oils from medicinal plants to control plant pathogens. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, Botucatu, v. 17, n. 1, p. 45-50, 2015.

FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. A.; RIBEIRO, V. Q. **Feijão-Caupi. Avanços Tecnológicos**. Embrapa Informação Tecnológica. pp. 519, 2005.

FREIRE FILHO, F. R.; RIBEIRO, V. Q.; ROCHA, M. de M.; SILVA, K. J. D.; NOGUEIRA, M. do S. da R.; RODRIGUES, E. V. **Feijão-caupi: produção, melhoramento genético, avanços e desafios**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica. 2011. 81p.

GARMUS, T.; PAVIANI, L.; QUEIROGA, C.; CABRAL, F. Extratos de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) obtidos por extração sequencial em leito fixo usando CO<sub>2</sub> supercrítico, etanol e água como solventes. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 2, p. 4690-4696, 2015.

HARMAN, G. E.; HOWELL, C. R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. *Trichoderma* species - opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews. Microbiology**, London, v.2, p. 43-56, 2004.

INDEX FUNGORUM: disponível em:

<<http://www.indexfungorum.org/names/namesrecord.asp?recordID=309351>> Acesso em: 01 abr 2019.

KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; RESENDE, J. A. M. **Manual de fitopatologia: Doenças de plantas cultivadas**. 4. ed. Piracicaba: Ceres, 2011. v.2, 663 p.

KNAAK, N.; FIUZA, L. Potencial dos óleos essenciais de plantas no controle de insetos e microrganismos. **Neotropical Biology and Conservation**, São Leopoldo, v. 5, n. 2, p. 120-132. 2010.

LEE, Y.; KIM, J.; SHIN, S.; LEE, S.; PARK, I. I. Antifungal activity of Myrtaceae essential oils and their components against three phytopathogenic fungi. **Flavour and Fragrance Journal**, Chichester, v. 23, p. 23-28, 2008.

LORENZETTI, E. R.; MONTEIRO, F. P.; SOUZA, P. E. ; SOUZA, R. J. ; SCALICE, H. K. ; DIOGO JR, R.; PIRES, M. S. O. Bioatividade de óleos essenciais no controle de *Botrytis cinerea* isolado de morangueiro. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, Botucatu, v.13, especial, p.619-627, 2011.

- LORENZI, H.; MATOS F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 512p.
- MAFIA, R. G.; ALFENAS, A. C.; REZENDE JÚNIOR, M. F. R.; Tombamento de mudas de espécies florestais causado por *Sclerotium rolfsii* Sacc. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 31, n. 4, p. 629-634, 2007.
- MASSOLA JÚNIOR, N. S.; KRUGNER, T. L. Fungos fitopatogênicos. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIM FILHO, A. **Manual de fitopatologia**. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2011, v. 1, cap. 8, p. 149-206.
- MELO, F. B.; BELTRÃO, N. E. M.; SILVA, P. H. S. **Cultivo da mamona (*Ricinus communis* L.) consorciada com feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.) no Semiárido**. Teresina: Embrapa Meio-Norte. pp 89. 2003.
- MELO, I. S. Agentes microbianos no controle de fungos fitopatogênicos. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Eds.) **Controle biológico**. Vol.1. Jaguariúna SP. EMBRAPA. p.17-67. 1998.
- MENDONÇA, C.S. **Efeito do Ácidoindolbutírico no enraizamento de estacas de AlecrimPimenta (*Lippia sidoides* Cham.)**. 1997. 43f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 1997
- MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T.; PERUCH, L. A. M.; MENEZES, M. Importância dos patógenos e das doenças radiculares em solos tropicais. In: MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T.; MENEZES, M. **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, p. 1-18. 2005.
- MORAES, J. G. L. **Comportamento de genótipos de feijão-de-corda sob infestação de pragas**. 2007 Fortaleza CE. Universidade Federal do Ceará. 2007.
- MORANDI, M. A. B.; BETTIOL, W. Controle biológico de doenças de plantas no Brasil. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Ed.). **Biocontrole de doenças de plantas: usos e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. p. 15-28. 2009.
- MORANDI, M. A. B.; PAULA JÚNIOR, T. J.; BETTIOL, W.; TEXEIRA, H. Controle biológico de fungos fitopatogênicos. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 30, n. 251, p. 73-82, 2009.
- MORDUE, J. E. M. *Corticium rolfsii*. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1974. 2 p. (C.M.I. Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria, 410).
- MYCOBANK. **Fungal databases: nomenclature and species bank** [online]. Utrecht: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Center, 2018. Disponível em: <<http://www.mycobank.org/Biolomics.aspx?Table=Mycobank&Page=200&ViewMode=Basic>> Acesso em: 01 abr. 2019.
- NECHET, K. L.; HALFELD-VIEIRA, B. A. Caracterização de isolados de *Rhizoctonia* spp., associados à mela do feijão-caupi (*Vigna unguiculata*), coletados em Roraima. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília. v. 31, p. 505-508, 2006.
- NEVES, A. C.; CÂMARA, J. A. S.; CARDOSO, M. J.; SILVA, P. H. S.; SOBRINHO, C. A. **Cultivo do feijão-caupi em sistema agrícola familiar**. Teresina- PI: Embrapa Meio Norte, 2011. p. 15 (Circular Técnica, 51)
- OLIVEIRA, A. P.; TAVARES SOBRINHO, J.; NASCIMENTO, J. T.; ALVES, A. U.; ALBUQUERQUE, I. C.; BRUNO, G. B. Avaliação de linhagens e cultivares de feijão-caupi,



em Areia, PB. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 2, p. 180-182, 2002.

OLIVEIRA, I. P. A Cultura do caupi nas condições de clima e solo dos trópicos úmido e semiárido do Brasil. In: ARAÚJO, J. P. P.; WATT, E. E. (Org.). **O Caupi no Brasil**. IITA/Embrapa. p 722.

PAZ-LIMA, M. L., TAVARES, M. L., MALAFAIA, G., RUARO, L., SALES, A. M., & CUNHA, P. C. Reação de suscetibilidade e distribuição espacial de *Sclerotium rolfsii* em genótipos de feijoeiro. **Global Science and Technology**, Rio Verde, v. 8, n. 1, 2015.

PIO-RIBEIRO, G.; ASSIS FILHO, F. M.; ANDRADE, G. P. Doenças do caupi. In: KIMATI, H.; AMORIM, J.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L.F.A. **Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2, p.215-222.

POLTRONIERI, L. S.; TRINDADE, R. S.; SILVA, J. F. A. F. **Principais doenças do caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) no Pará e recomendações de controle**. Belém: Embrapa/CPATU, 1994. 24 p. (Documentos, 75).

PUNJA, Z. K. Comparative efficacy of bacteria, fungi and yeasts as biological control agents for diseases of vegetables crops. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Oxon, v. 19, p. 315-323, 1997.

PUNJA, Z. K. The biology, ecology and control of *Sclerotium rolfsii*. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 23, p.97-127, 1985.

PUNJA, Z. K.; JENKINS, S. F.; GROGAN R. G. Effect of volatile compounds, nutrients and source of sclerotia on eruptive sclerotial germination of *Sclerotium rolfsii*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 74, n. 12, p. 1290-1295, 1984.

PUNJA, Z. K.; RAHE, J. E. Sclerotium. In: SINGLE TON, L. L.; MIHAIL, J. D.; RUSH, C. M. **Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi**. St. Paul: Minnesota APS Press, 1992. p. 166-170.

RASOOLI, I.; REZAEI, M. B.; ALLAMEH, A. Growth inhibition and morphological alterations of *Aspergillus niger* by essential oils from *Thymus eriocalyx* and *Thymus x-parlock*. **Food Control**, Guildford, v. 17, n. 5, p. 359-364, 2006.

ROBBS, C. F. Controle biológico de doenças de plantas. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 15, n. 167, p. 63-71, 1991.

RODRIGUES, A. A. C.; MENEZES, M. Detecção de fungos endofíticos em sementes de caupi provenientes de serra talhada e de caruaru, Estado de Pernambuco. **Fitopatologia Brasileira**. Brasília, v. 27, p. 532-537. 2002.

SALES JÚNIOR, R.; MEDEIROS, E. V.; ANDRADE, D. E. G. T.; PERUCH, L. A. M. RODRIGUES, V. J. L. B. Controle químico de doenças radiculares. In: MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T.; MENEZES, M. **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2005. p. 345-366.

SANTOS, I.; TOMAZELI, V. N.; MORALES, R. G. F. Resíduos orgânicos e solarização para o controle das doenças do feijoeiro causadas por *Sclerotium rolfsii*. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. cap. 13, p.209- 224.

SCHISLER, D. A.; JANISIEWICZ, W. J.; BOECKHOUT, T.; KURTZMAN, C. P. Agriculturally important yeasts: Biological control of field and postharvest diseases using

- yeasts antagonists, and yeasts pathogens of plants. In: KURTZMAN CP, FELL JW, BOECKHOUT T (Eds). **The yeasts: a taxonomic study**. London: Elsevier, London, United Kingdom, 45-58. 2011.
- SCHWAN-ESTRADA, K. R. F., STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. S. Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos. **Revista Floresta**. Curitiba, v. 30, p. 129-137. 2000.
- SHALABY, M.E.S.; EL NADY, M. F. Application of *Saccharomyces cerevisiae* as a biocontrol agent against *Fusarium* infection of sugar beet plants. **Acta Biologica Szegediensis**, Szeged, v. 52, n. 2, p. 271-275, 2008.
- SILVA, J. A., OLIVEIRA, M. G., SOUZA, L. T., ASSUNÇÃO, I. P., LIMA, G. A., & MICHEREFF, S. J. Reação de genótipos de feijão-fava a *Sclerotium rolfsii*. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 1, p. 98-101, 2014.
- SILVA, M. B.; MORANDI, M. A. B.; PAULA JÚNIOR, T. J.; VENZON, M.; FONSECA. Extratos de plantas e seus derivados no controle de doenças e pragas. In: VENZON, M.; PAULA JÚNIOR, T. J.; PALLINI, A. **Controle alternativo de pragas e doenças na agricultura orgânica**. Viçosa: Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais- Zona da Mata, 2010, cap.3, p. 33-54.
- SINGH, B. B., EHLERS, J. D., SHARMA, B., FREIRE FILHO, F. R. **Recent Progress In Cowpea breeding**. In: FATOKUN, C. A., TARAWALI, S. A., SINGH, B. B., KORMAWA, P. M., TAMO, M. (Eds). Challenges and opportunities for enhancing sustainable cowpea production. Ibadan: IITA, P. 22-40. 2002.
- SINGH, S. R.; ALLEN, D. J. **Cowpea pests and diseases**. Ibadan: International Institute of Tropical Agriculture, 1979, 85 p.
- SINGH, U.P.; SARMA, B.K. **Biology and control of *Sclerotium rolfsii*: the incitant of collar rot of *Cicer arietinum***. Saarbrücken: VDM, 2009, 198p.
- SPECIAN, V., DE OLIVEIRA, R. C., & DE SOUZA DINIZ, S. P. S. Atividade do óleo essencial de tomilho (*thymus vulgaris* L.) contra fungos fitopatogênicos. **Journal of Health Sciences**, Assen, v. 11, n. 4, 2015.
- SURHONE, L. M.; TENNOE, M. T.; HENSSONOW, S. F. ***Sclerotium***. Mauritius: Betascript Publishing, 2011, 56p.
- TAUBENHAUS, J. J. Recent studies on *Sclerotium rolfsii* Sacc. **Journal of Agricultural Reserach**, v. 18, n. 3, p. 127-138, 1919.
- TEÓFILO, E. M.; DUTRA, A. S.; PITOMBEIRA, J. B.; DIAS, F. T. C.; BARBOSA, F. de S. Potencial fisiológico de sementes de feijão-caupi produzidas em duas regiões do Estado do Ceará. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 39, n. 3, p. 443-448, 2008.
- TERBLANCHÉ, F. C.; KORNELIUS, G. Essential oil constituents of the genus *Lippia* (Verbenaceae): a literature review. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 8, n. 2, p. 471-485, Mar./Abr. 1996.
- WHIPPS, J. M. Microbial interactions and biocontrol in the rizosphere. **Journal Experimental Botany**, Oxford, v. 52, p.487-511, 2001.
- XU, Z.; HARRINGTON, T. C.; GLEASON, M. I.; BATZER, J. C. Phylogenetic placement of plant pathogenic *Sclerotium* species among teleomorph genera. **Mycologia**, Lawrence, v.2, n. 102, p. 337-346, 2010

## Capítulo II

---

### **Chemical composition and control of *Sclerotium rolfsii* Sacc by essential oils**

**Chemical composition and control of *Sclerotium rolfsii* Sacc by essential oils**

SANTOS, ANANDA ROSA BESERRA<sup>1</sup>, LARANJEIRA, DELSON<sup>1</sup>, DIAS, LARISSE RAQUEL CARVALHO<sup>2</sup>, SOUSA, EDYMILAIS DA SILVA<sup>3</sup>, MELO, CHRISTIAN DÁRIO SILVA DE<sup>3</sup>, LIMA, SIDNEY GONÇALO DE<sup>3</sup>, SILVA, PAULO HENRIQUE SOARES DA<sup>4</sup>, ATHAYDE SOBRINHO, CANDIDO<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Department of Agriculture, Federal Rural University of Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, 52171-900 Recife – PE, Brazil

<sup>2</sup> Agrarian Sciences Centre, Maranhão State University, Cidade Universitária Paulo VI, S/N, 65055-310, São Luís, MA, Brazil

<sup>3</sup> Organic Geochemistry Lab, Chemistry Program, Federal University of Piauí, 64049-550, Bairro Ininga – PI, Brazil.

<sup>4</sup> Embrapa Mid-North, 64008-780 - Teresina – PI, Brazil

**Keywords:** antifungal activity, alternative control, sclerotium wilt, *Vigna unguiculata*.

**Running Head:** Control of *Sclerotium rolfsii* with essential oil.

**Session:** Agrarian Sciencies

Correspondence to: Ananda Rosa Beserra Santos

E-mail: anandarbsanto@gmail.com

## ABSTRACT

Essential oils of *Lippia sidoides* Cham, *Lippia lasiocalycina* Cham, *Lippia origanoides* Kunth - Teresina, *Lippia origanoides* Kunth - Jatobá, *Mesosphaerum suaveolens* (L.) Kuntze, *Croton sonderianus* Muell. Arg. and *Croton zehntneri* Pax et Hoffm. were evaluated regarding the chemical composition and in controlling the *Sclerotium rolfsii* Sacc. The experiments were carried out in a completely randomized design with five concentrations and the control (without oil application): 0.0313; 0.0625; 0.1250; 0.2500 and 0.500 ml kg<sup>-1</sup> in Petri dishes with PDA medium (potato-dextrose-agar). The evaluations consisted in daily measurements of the colony diameter in diametrically opposite directions, 24 h after the experiment installation and maintained until the radial reach of the colony on the edges of the Petri dish, in one of the treatments. The chemical composition of the essential oils were evaluated by GC-MS and the following compounds were identified: thymol (33.5%, *L. sidoides*); piperitenone oxide (67.7%, *L. lasiocalycina*); borneol (19.2%, *L. origanoides*); borneol carvacrol (34.4%, *L. origanoides* - Jatobá); sabiene (30.3%, *M. suaveolens*); β-sabinene (30.5%, *C. sonderianus*); and estragole (90.1%, *C. zehntneri*). The *S. rolfsii* fungus is highly sensitive to *L. sidoides*, *L. origanoides* - Jatobá and *C. zehntneri* essential oils, suggesting its use in the management of Sclerotium wilt in cowpea.

**Keywords:** antifungal activity, alternative control, sclerotium wilt, *Vigna unguiculata*.

## INTRODUCTION

The cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) is very important in human nutrition because it is a natural source of proteins, calories, vitamins and minerals (Freire Filho et al., 2011). However, although rustic, *V. unguiculata* is affected by some diseases, among them, the sclerotium wilt. This disease is caused by the polyphagous and cosmopolitan fungus *Sclerotium rolfsii* Sacc, that causes high yield loss in infected plants (Bedendo, 2011).

In cowpea, the disease occurs in the stem, close to the soil surface, and present as a more representative symptom a tangle of white mycelium, which later develops into yellow tones and, under this tangle, there is an intense disruption of the parasitic plant tissue (Athayde Sobrinho et al., 2005). The disease can be lethal, regardless the phenological stage of the crop, leading to the reduction of the stand, with direct effects on grain yield (Cardoso, 1994).

Among the management practices aiming the disease control, the use of resistant cultivars (Adandonon et al., 2006; Silva et al., 2014); crop rotation (Bedendo, 2011); and the use of biocontrolling microorganisms (Punja, 1985; Singh et al., 2002, Adandonon et al., 2006; Pacheco et al., 2016); the use of alternative products based on plant extracts and vegetable oils (Brum et al., 2014) and the use of chemical fungicides (Punja, 1985; Sales Júnior et al., 2005; Athayde Sobrinho et al., 2005; Bedendo, 2011) can be highlighted.

The lack of registered fungicides for the crop has stimulated the search for alternative products for the management of sclerotium wilt. Substances such as essential oils, crude extracts and tinctures from plants have been studied because they have in their composition molecules with fungicidal properties (Matos, 1997). In addition to being characterized as secondary plant metabolites and of low toxicity to humans, they are extensively tested in *in vitro* and *in vivo* control of phytopathogens and seed treatment (Rodrigues et al., 2006).

The studies have reported biological properties for essential oil, rich in thymol and carvacrol, as antimicrobial, anti-inflammatory, antioxidant and larvicidal properties (Damasceno et al., 2011; Carvalho et al., 2013; Guimarães et al., 2014).

Considering the studies that report the antimicrobial activity of essential oils of plants existing in the ecosystems of the Mid-North region of Brazil, associated with the sensitivity of *S. rolfsii* to essential oils, the objective of this research was to identify the chemical composition of essential oils of native plants of the Mid-North region of Brazil, evaluating the mycelial sensitivity and its potential use in the control of *S. rolfsii*, agent of sclerotium wilt in cowpea.

## MATERIAL AND METHODS

### EXPERIMENT MANAGEMENT, ISOLATION AND PATHOGEN MAINTENANCE

The experiments were carried out in the Plant Pathology Laboratory at Embrapa Mid-North, where the *S. rolfsii* fungus was isolated from cowpea plants with typical symptoms of the disease. Disinfestation was performed with 70% alcohol for 30 seconds and 1.5% sodium hypochlorite for 2 minutes. To remove excess hypochlorite, the material was immersed in two consecutive portions of distilled and sterilized water. The tissue fragments were then transferred to Petri dishes containing PDA medium (Potato, Dextrose and Agar) and subsequently incubated at 25°C for 7 days. After this period the maintenance was performed through repricing in Petri dishes with PDA medium.

### EXTRATION AND ANALYSIS OF THE CHEMICAL COMPOSITION OF ESSENTIAL OILS

The essential oils of six botanical species belonging to the Brazilian Mid-North region (Table 1) were obtained. All studied species are spontaneously occurring shrubs or sub-bushes, none of them are still cultivated, being all vegetatively propagated.

Table 1. Species, registration number and part of the plant used to obtain the tested essential oils. Teresina, PI, 2018.

Specie	Origin	Register	Parto f the plant
<i>Lippia sidoides</i>	Teresina	CEN 92438	Leaf
<i>Lippia lasiocalycina</i>	São João do Piauí	CEN 92437	Leaf
<i>Lippia origanoides</i>	Gilbués	CEN 92436	Leaf and inflorescence

<i>Lippia origanoides</i> - Jatobá	Jatobá do Piauí	CESJ 70120	Leaf
<i>Mesosphaerum suaveolens</i>	Parnaíba	IPA 57264	Leaf
<i>Croton sonderianus</i>	Parnaíba	CEN 92500	Leaf
<i>Croton zehntneri</i>	Valença	TEPB 30944	Leaf

The extraction of the essential oils was carried out by the hydrodistillation method, using the Clevenger apparatus, coupled to the heating mantle used as heat source for the system (Gomes et al., 2014). In each extraction, 200g of dehydrated and previously crushed leaves were used. The inflorescences were also used for *L. origanoides*.

The gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) was performed on a Shimadzu GC-17A / MS QP5050A apparatus with electron impact ionization at 70 and V. Mass spectra were obtained from 43 to 350 m/z. The temperature of the injector / detector and the thermal program were maintained at 240°C. The carrier gas used was helium. Identification was made by comparison with standard spectra of the internal data library and retention times based on the linear retention index. The GC-FID chromatogram was used to determine the relative concentration using the peak areas in the Agilent 5975C system, which method of analysis was similar to the GC-MS system, previously described. It was used a DB-5 capillary column (30m 0.25mm di, 0.25µm film; J & W Scientific, Folsom, CA, USA) and hydrogen was used as carrier gas.

## EVALUATION OF FUNGUS SENSITIVITY TO OILS

The experiment was conducted in a completely randomized design, with five concentrations and one control (without oil): 0.0313; 0.0625; 0.125; 0.2500 and; 0.5000 ml kg<sup>-1</sup> in PDA culture medium with four replicates, each replicate being represented by three Petri dishes with 90 mm in diameter.

The oil was deposited in the center of the Petri dishes on the solidified medium and evenly distributed with Drigalsky's Spatula. Immediately after the oil distribution, a 5 mm diameter disk containing fragments of the four-day old *S. rolfsii* culture grown in PDA (Veloso



et al., 2012) was deposited in the center of each plate. The plates were then sealed with plastic film and incubated in BOD at 25° C and photoperiod of 12h. The control group received the disc with fungal structures.

The evaluation consisted in the daily measurement of the diameter of the colonies in diametrically opposite directions, with the aid of a millimeter rule, obtaining an average for each repetition. Evaluations were initiated 24 h after the experiment set up and maintained until the radial growth of the colony reached, in one of the treatments, the total diameter of the Petri dish. With the obtained data, the growth rate of the fungus was determined in the different concentrations tested, using the formula adapted from Lilly and Barnet (1951).  $T_x = (C_n + 1 - C_n) / T$ , where:  $T_x$  = growth rate,  $C_n$  = growth at incubation time "n",  $C_n + 1$  = growth at incubation time n + 1 and T = time interval considered, in this case, 24 hours.

The mycelial growth values were transformed into percentage of inhibition, and the inhibitory concentrations of 50% of the mycelial growth (IC 50) were obtained from the logarithmic regressions for each oil / species. For that, the statistical software Costat (Tonin et al 2013) was used. From the IC 50 data it was possible to classify the sensitivity of the fungus to the oils in: highly sensitive (HS) when  $IC_{50} < 1 \text{ mg L}^{-1}$ ; ( $1 \text{ ml kg}^{-1} \leq IC_{50} \leq 40 \text{ ml kg}^{-1}$ ) and non-sensitive (NS) ( $IC_{50} \geq 40 \text{ ml kg}^{-1}$ ), defining the fungitoxicity (Edgington, et al 1971; Tonin et al 2013).

The data obtained for mycelial growth of *S. rolfssii* were submitted to variance analysis and polynomial regression to define the model that best explains the behavior of the studied variable, with the aid of the Assisat software, version 7.7 beta (Assis e Silva, 2013).

## RESULTS AND DISCUSSION

The chemical composition of the essential oils obtained by GC-MS identified 73 compounds in the evaluated oils, varying from 75.2% (*L. origanoides*) to 100 % (*L. origanoides* – Jatobá and *C. zehntneri*) of the volatile oils composition. Considering each specie, the main constituents were thymol (*L. sidoides*); piperitenone oxide (*L. lasiocalicyna*); borneol (*L.*

*origanoides* - Teresina); carvacrol (*L. origanoides* - Jatobá); sabinene (*M. suaveolens*);  $\beta$ -sabinene (*C. sonderianus*); and estragole (*C. zehntneri*) (Table 2). These results are identical to those found by Carvalho et al., 2013; Morão et al., 2016; Silva et al., 2003; Costa et al., 2013; Costa et al., 2008.

Table 2. Retention index (RI) and chemical composition of essential oils of *Lippia sidoides* (Ls), *Lippia lasiocalycina* (Ll), *Lippia origanoides* (Lo), *Lippia origanoides* Jatobá (Lo-J), *Mesosphaerum suaveolens* (Ms), *Croton sonderianus* (Cs) and *Croton zehntneri* (Cz).

RI <sup>a</sup>	RI <sup>b</sup>	Compound	Ls	Ll	Lo	Lo-J	Ms	Cs	Cz
850	866	Z-3-HEXANEOL	0.5	0.3	0.4	-	-	-	-
924	921	$\alpha$ -THUJENE	1.1	-	-	1.1	0.9	-	-
932	928	$\alpha$ -PINENE	0.5	0.5	0.6	0.3	2.8	0.6	-
946	943	CAMPHENE	-	-	1.8	-	-	-	-
969	967	SABINENE	-	-	0.8	-	30.0	-	0.2
974	971	OCTEN-3-OL	0.7	-	1.1	-	7.0	-	-
988	984	$\beta$ -MYRCENE	2.2	0.2	0.5	2.0	0.2	-	-
1002	1001	$\alpha$ -PHELLANDRENE	-	-	-	0.1	-	1.2	-
1014	1011	$\alpha$ -TERPINENE	1.6	-	-	1.7	0.2	-	-
1020	1019	PARA-CYMENE	13.1	0.5	-	13.3	3.3	0.5	-
1024	1023	LIMONENE	0.8	11.9	1.4	0.4	1.2	-	-
1025	1023	$\beta$ -PHELLANDRENE	-	-	-	-	-	1.3	-
1026	1025	1,8-CINEOLE	2.3	-	6.9	0.2	11.3	2.9	2.9
1032	1030	Z-OCIMENE	0.2	0.5	-	-	-	-	-
1044	1040	E- $\beta$ -OCIMENE	-	0.2	-	-	0.2	-	0.6
1054	1052	$\gamma$ -TERPINENE	4.3	0.5	-	7.8	0.3	0.3	-
1065	1060	Z SABINENE HIDRATE	0.4	-	-	-	-	-	-
1083	1083	FENCHONE	-	-	-	-	1.0	-	-
1086	1083	TERPINOLENE	-	-	0.4	-	-	0.5	-
1095	1093	LINALOOL	0.6	0.4	-	-	0.3	0.7	-
1114	1109	FENCHOL	-	-	-	-	0.5	-	-
1119	1115	$\rho$ -MENTHA-E-2,8-DIEN-1-OL	-	0.2	-	-	-	-	-
1133	1129	Z- $\rho$ -MENTHA-2,8-DIEN-1-OL	-	0.2	-	-	-	-	-
1140	1144	E-VERBENOL	-	0.2	-	-	-	-	-
1165	1161	BORNEOL	-	-	19.2	-	-	0.4	-
1174	1172	4-TERPINEOL	1.6	-	0.6	0.8	2.6	1.1	-
1186	1185	$\alpha$ -TERPINEOL	0.8	0.5	0.7	-	0.3	0.3	0.8
1195	1195	ESTRAGOLEE	-	-	-	-	-	-	90.1
1232	1229	THYMOL METHYL ETHER	2.8	-	-	5.5	-	-	-
1241	1239	CARVACROL, METHYL ETHER	-	-	-	0.4	-	-	-
1289	1290	THYMOL	33.2	1.2	-	3.0	-	-	-
1298	1297	CARVACROL	0.6	-	-	54.5	-	-	-
1335	1331	$\delta$ -ELEMENE	-	-	-	-	-	0.6	-
1339	1332	E-CARVIL ACETATE	-	0.2	-	-	-	-	-

1340	1336	PIPERITENONE	-	2.2	-	-	-	-	-
1349	1348	THYMOL ACETATE	0.3	-	-	0.5	-	-	-
1366	1366	PIPERITENONE OXIDE	-	67.2	-	-	-	-	-
1374	1370	$\alpha$ -COPAENE	-	-	0.9	0.6	-	0.4	-
1387	1379	$\beta$ -BOURBONENE	-	-	-	-	1.1	2.3	-
1388	1396	ISO JASMONE	-	0.2	-	-	-	-	-
1389	1386	$\beta$ -ELEMENE	-	-	1.4	-	1.0	12.7	-
1410	1407	$\alpha$ -CEDRENE	-	-	0.4	-	-	-	-
1417	1414	TRANS-CARYOPHYLLENE	17.4	-	2.6	4.0	5.1	0.4	2.1
1419	1419	$\beta$ -CEDRENE	-	-	1.3	-	-	-	-
1431	1423	$\beta$ -GURJINENE	-	-	-	-	-	3.8	-
1432	1430	$\alpha$ -BERGAMOTENE	-	-	-	0.3	-	-	-
1437	1433	$\alpha$ -GUAIENE	-	-	0.4	-	2.2	-	-
1439	1433	AROMADENDRENE	1.2	-	-	-	-	2.3	-
1452	1448	$\alpha$ -HUMULENE	0.9	-	16.0	0.1	0.3	1.7	-
1453	1446	GERANYL ACETONE	-	6.4	-	-	-	-	-
1454	1450	$\beta$ -FARNESENE	-	0.2	-	-	-	-	-
1458	1356	ALLOAROMADENDRENE	-	-	-	-	4.3	1.3	-
1464	1455	$\alpha$ -ACORADIENE	-	-	0.6	-	-	-	-
1483	1471	$\alpha$ -AMORPHENE	-	-	-	-	-	7.2	-
1484	1476	GERMACRENE-D	1.1	-	3.9	-	5.9	2.0	-
1489	1481	$\beta$ -SABINENO	-	-	2.4	0.8	-	30.5	-
1494	1491	BICICLOGERMACRENE	2.8	-	-	-	-	0.4	-
1496	1488	VALENCENE	-	-	2.2	1.6	-	-	-
1498	1494	$\alpha$ -SELINENE	-	-	1.5	-	-	-	-
1500	1491	BICYCLOGERMACRENE	-	1.3	-	-	0.3	0.5	3.3
1505	1502	$\beta$ -BISABOLENE	-	0.5	0.3	-	-	-	-
1508	1500	GERMACRENE A	-	-	0.7	-	-	0.3	-
1513	1509	$\gamma$ -CADINENE	-	-	-	-	-	2.1	-
1522	1518	$\delta$ -CADINENE	0.4	-	2.6	0.6	0.8	0.3	-
1539	1536	$\alpha$ -COPAENE-11-OL	-	-	0.5	-	-	-	-
1577	1573	SPATHULENOL	0.8	0.2	-	0.3	9.0	12.7	-
1578	1579	EPIGLOBULOL	-	-	-	-	-	3.4	-
1582	1578	CARYOPHILLENE OXIDE	3.7	0.2	0.5	0.4	2.2	-	-
1586	1586	ISOSPATHULENOL	-	1.2	-	-	-	-	-
1592	1587	VIRIDIFLOROL	-	-	-	-	0.4	0.7	-
1606	1604	HUMULENE EPOXIDE	-	-	2.5	-	-	-	-
1651	1649	POGOSTOL	-	-	-	-	3.9	-	-

IR<sup>a</sup>: relative retention index, calculated by the Van den dool equation. %: Compound percentage. The compounds of the table are in ascending order of column Rxi-5HT, 30m × 0,25mm elution. IR<sup>b</sup>: experimental retention indexes.

The chemical composition variability of each oil is of extreme importance for its effective action, since the antimicrobial activity is directly related to the synergism of its chemical composition, where compounds like alcohols, phenols, terpenes and ketones are pointed out as the main responsible ones by toxic properties (Sellamuthu et al., 2013). Terpenes (Table 3) are considered to be the secondary metabolites most produced by plants with applications in different areas, such as in the pharmaceutical and solvent industries (Wang et al., 2016). According to Sangwan et al. (2001), the genotypic characteristics associated with the environmental factors can be determinant in the biosynthesis of the secondary metabolites, including the essential oils. For example, the climatic conditions may influence the enzymatic activities of a particular plant species (Barros et al., 2009).

Table 3. Percentage of chemical compounds by group from essential oils of *Lippia sidoides* (Ls), *Lippia lasiocalycina* (Ll), *Lippia origanoides* (Lo), *Lippia origanoides* Jatobá (Lo-J), *Mesosphaerum suaveolens* (Ms), *Croton sonderianus* (Cs) and *Croton zehntneri* (Cz).

Group of compounds	%						
	<i>Ls</i>	<i>Ll</i>	<i>Lo</i>	<i>Lo - J</i>	<i>Ms</i>	<i>Cs</i>	<i>Cz</i>
Monoterpenes hydrocarbons	57.25	14.52	4.19	26.52	46.14	4.36	0.84
Oxygenated monoterpenes	10.39	72.36	29.86	64.75	16.04	5.37	93.75
Sesquiterpenes hydrocarbons	23.94	2.02	37.24	8	20.91	68.7	5.41
Oxygenated sesquiterpenes	4.55	8.05	3.9	0.73	15.54	16.79	v
Other	0.48	v	0.4	v	v	v	v
Not identified	3.39	3.05	24.41	v	1.37	4.78	v

v: trace (<0.05%)

Two chemical compounds, thymol and carvacrol, were in higher amounts in the *Lippia* genus. The *L. sidoides* oil presented 33.5% of thymol and 0.6% of carvacrol, in addition to 17.5% of trans-caryophyllene, while the *L. origanoides* (Jatobá) oil presented 3.0% of thymol and 54.4% of carvacrol. These data are compatible with those found by other authors (Craveiro, 1981; Teixeira, 2013). For the cited authors, the main volatile constituents frequently found in essential oils of different *Lippia* species are thymol, carvacrol, 1,8-cineole, limonene, p-

cymene, linalool,  $\alpha$ -pinene and  $\beta$ -caryophyllene. The cited oils were effective in controlling the mycelial growth of *S. rolfsii*.

The *L. origanoides* oil presented the borneol as the compound with the higher amount, with 19.2% and  $\alpha$ -humulene with 16.0% of the chemical composition, in accordance with other studies that, with different amounts, also observed the same compounds, indicating high potential in controlling microorganisms (Almeida et al., 2016). The oil of *L. lasiocalycina* presented 67.2% of piperitenone oxide and 11.9% of limonene in the chemical composition, in accordance with the results observed by Almeida et al. (2018).

Species of the *Croton* genus, when compared, presented different chemical composition. The *C. zehntneri* oil presented estragole (90.9%) as the main compound, in accordance to Costa et al. (2008) and Fontenelle et al. (2008) that identified, respectively, 76.8% and 72.9% of estragole as the main compound. However, the *C. sonderianus* oil presented the main constituents the sabinene (30.0%) and eucalyptol (11.4%), in accordance to Costa et al. (2008) and Costa et al. (2013).

The essential oil of *M. suaveolens* presented sabinene (3.0%) and 1.8-cineole (12.0%) as the main constituents with different composition from those observed by other authors (Martins et al., 2006; Branquinho, 2015).

The main constituent of the *L. solides* oil in this present study (tymol-33.5%) was already studied, being described as a powerful anti-septic in the phenol group, with anti-bacterial and anti-fungi (Lemos et al. 1990). Carvacrol, the main constituent of *L. origanoides* Jatobá oil (54.4%), has been attributed to anti-microbial activities (Lorenzi and Matos, 2002; Queiroz et al., 2014). Studying essential oil of *L. sidoides*, Gonçalves et al. (2015) verified the total inhibition of the mycelial growth of *R. solani* and *S. rolfsii* in the concentration of 400  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Similar results were obtained by Athayde Sobrinho et al. (2017) with *L. sidoides* essential oil in the inhibition of mycelial growth and formation of microspheres of the fungus

*Macrophomina phaseolina* at the concentrations of 0.250 and 0.125 ml L<sup>-1</sup>, respectively. This result proved the efficacy of the oil on the causal agent of gray stem rot in cowpea.

There are results indicating that *L. sidoides* essential oil present epidemiological properties. The main constituent of *L. sidoides* oil in the present study (thymol - 33.5%) has already been reported, being described as a potent antiseptic in the phenol group, with antibacterial and antifungal properties (Lemos et al., 1990). Carvacrol, the main constituent *L. origanoides* – Jatobá oil (54.4%) is related to anti-microbial activities (Lorenzi and Matos, 2002; Queiroz et al., 2014). Studying *L. sidoides* essential oil, Gonçalves et al. (2015) verified the total inhibition of the mycelial growth of *R. solani* and *S. rolfsii* in the concentration of 400 µg mL<sup>-1</sup>. This result was obtained by Athayde Sobrinho et al. (2017) with an essential base of inhibition of the mycelial growth and formation of microsclerotia of the fungus *Macrophomina phaseolina* in the concentrations of 0.250 and 0.125 ml L<sup>-1</sup>, respectively. This result was verified on the causal agent of gray stem rot in cowpea.

There are no records for the control of filamentous fungi with the use of *L. origanoides* essential oil. However, Queiroz et al. (2014) verified the antimicrobial activity of the oil against *Staphylococcus aureus*, corroborating with the results observed by Sarrazin et al. (2015) that demonstrated the efficiency of *L. origanoides* in controlling *S. aureus* and *Escherichia coli*.

With regard to *L. lasiocalycina*, Oliveira (2014) observed that an increase in the concentration of its essential nutrient resulted in a decrease of the mycelial growth of *Moniliophthora perniciosa*, with minimum inhibition of 64.3% using the dose of 0.63 µl ml<sup>-1</sup>, detecting the efficiency in fungus control.

Considering the antifungal activity of species of the genus *Croton*, Peixinho et al. (2017) and Vidal et al. (2016) evaluated the *Croton conduplicatus* plant extract in the control of *Lasiodiplodia theobromae* and *Croton rhamnifolioides* in different species of fungi of the *Candida* genus *Candida*, respectively with successful results of control. These results were



different from those obtained in the present study (Table 4), in which the two species of the *Croton* genus presented a significant reduction in the growth of the *S. rolfsii* fungus.

The importance of *M. suaveolens* has been investigated due to its antifungal properties against *Mucor* sp. (Malele et al., 2003), antibacterial against gram-positive and gram-negative bacteria (Asekun, 1999), nematicide and larvicide against *Aedes aegypti* (Menezes, 2003), however no studies against phytopathogens.

The evaluation of the sensitivity of the fungus when challenged by compounds with fungitoxic activity is of great importance because it allows to maximize its efficiency. Normally this is done by determining the concentration capable of inhibiting 50% of the mycelial growth (IC<sub>50</sub>) (Tonin et al., 2013). From the measurements of colonies diameter and growth rate for each type of oil, IC<sub>50</sub> values were defined for all oils (Table 4). The determination coefficients (R<sup>2</sup>) ranged from 0.53 to 0.89 and the IC<sub>50</sub> from 0.23 to 3.00. It was possible to observe that the *S. rolfsii* fungus was sensible to the essential oils of *L. sidoides*, *L. organoides* - Jatobá and *C. zehntneri*. On the other hand, in relation to other essential oils, the *S. rolfsii* fungus presented moderate sensitivity.

Table 4. Oleic vegetable specie, regression equation, coefficient of determination (R<sup>2</sup>), inhibition concentration (IC<sub>50</sub>) and fungitoxicity of essential oils on the *in vitro* growth of *Sclerotium rolfsii*.

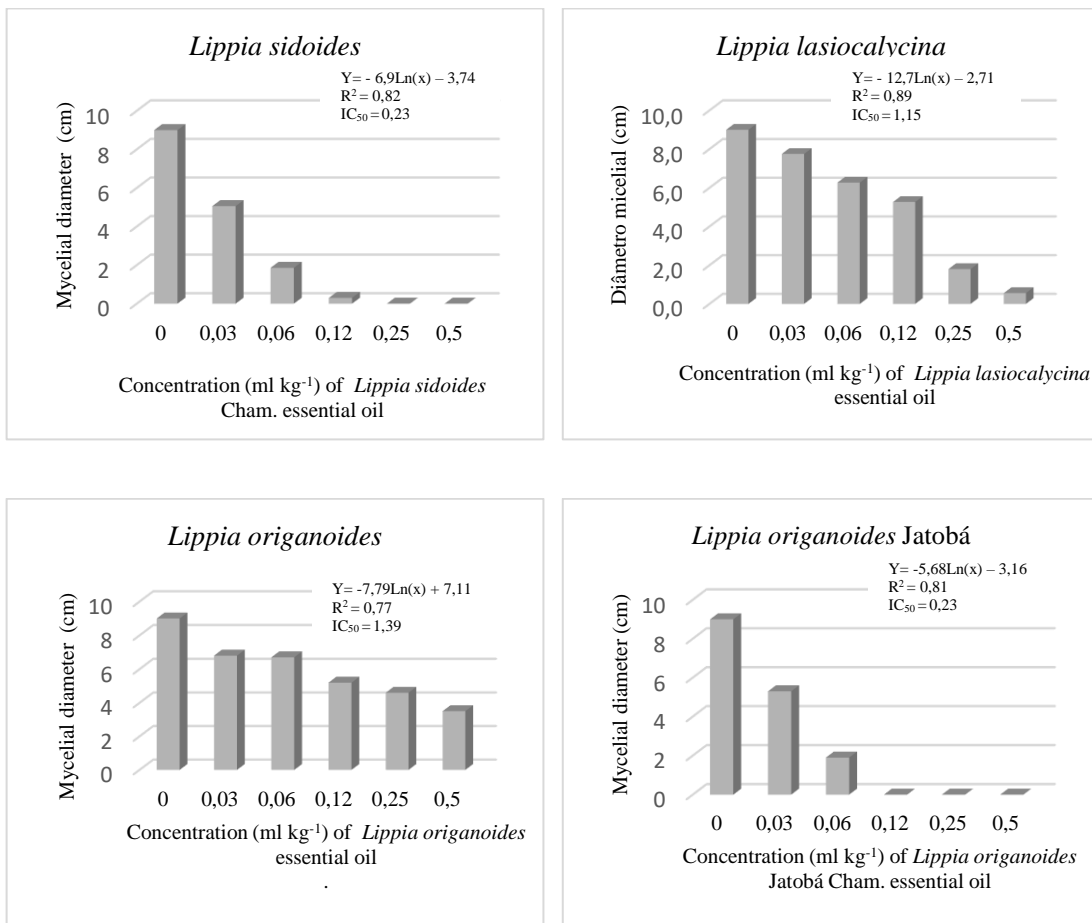
Specie	Equation *	R <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub> **	S***
		%	ml kg <sup>-1</sup>	
<i>Lippia sidoides</i>	Y = - 6.9Ln(x) - 3.74	0.82	0.23	HS
<i>Lippia lasiocalycina</i>	Y = - 12.7Ln(x) - 2.71	0.89	1.15	MS
<i>Lippia organoides</i>	Y = -7.79Ln(x) + 7.11	0.77	1.39	MS
<i>Lippia organoides</i> Jatobá	Y = -5.68Ln(x) - 3.16	0.81	0.23	HS
<i>Mesosphaerum suaveolens</i>	Y = -8.82Ln(x) + 12.96	0.81	2.61	MS
<i>Croton sonderianus</i>	Y = -10.81Ln(x) + 16.96	0.87	3.00	MS
<i>Croton zehntneri</i>	Y = -4.52Ln(x) + 1.21	0.53	0.48	HS

\*Y = inhibition percentage of the mycelial growth; x = concentration of the essential oil.

\*\* Value calculated based on the regression equation

\*\*\* Sensibility of *S. rolfsii* to the evaluated oils: HS = Highly Sensitive; MS = Moderately Sensitive

The sensitivity of fungi to a particular toxic substance can be expressed, according to Tonin et al. (2013) by ED<sub>50</sub> (effective dose), EC<sub>50</sub> (effective concentration) or IC<sub>50</sub> (inhibition concentration). If a fungus is sensitive to a given substance, its fungitoxicity becomes apparent, otherwise it will be innocuous (non-toxic). On the other hand, if a substance does not present fungitoxicity the fungus is considered insensitive (Reis et al., 2007). The oils that showed high toxicity, demonstrated by the high levels of inhibition (IC<sub>50</sub> < 1 ml kg<sup>-1</sup>) were *L. sidoides*, *L. organoides* - Jatobá and *C. zehntneri* (Figure 1).



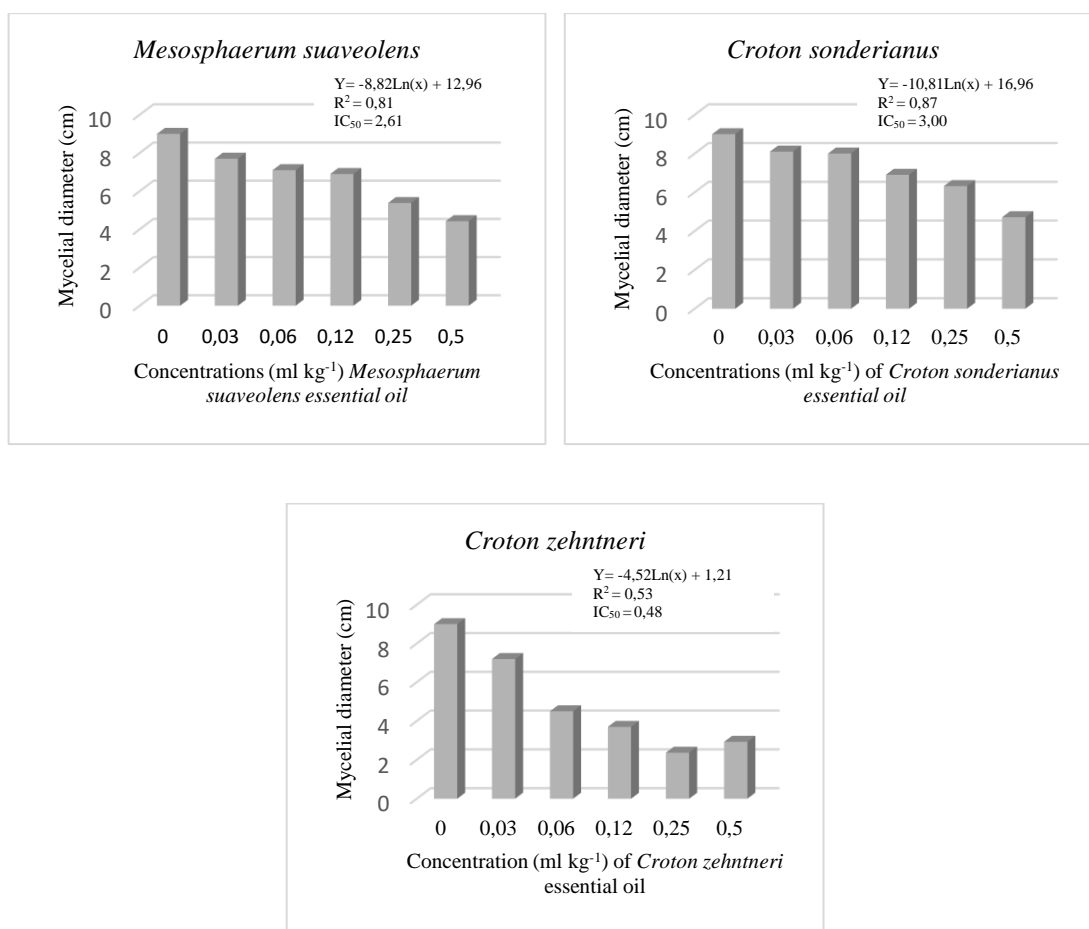


Figure 1. *In vitro* Mycelial growth of *Sclerotium rolfsii* in six concentrations (ml kg<sup>-1</sup>) of *L. sidoides*, *L. lasiocalycina*, *L. origanoides*, *L. origanoides* Jatobá, *M. suaveolens*, *C. sonderianus* and *C. zehntneri* essential oils. IC<sub>50</sub> = Concentration that inhibits 50% of the mycelial growth.

The antifungal properties of the essential oils are due to their lipophilic characteristics (Bakkali et al., 2008), which occurs with the presence of compounds such as monoterpene phenols, especially thymol, carvacrol and eugenol (Barrera-Necha et al., 2008). Thus, the hydrophobicity of the essential oil allows an interaction between it and the lipids of the cell membrane, interfering in its permeability and causing changes in its structure (Costa et al., 2011). Some of these alterations were confirmed by optical microscopy, where the *Syzygium aromaticum* essential oil significantly interfered in the mycelial growth of *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani* and *F. oxysporum*. In this study, several morphological alterations were

observed, such as the presence of vacuoles, disorganization of cellular contents, decrease in cell wall sharpness, intense fragmentation and less turgidity of hyphae (Costa et al., 2011).

As previously shown (Table 4 and Figure 1), among the tested oils, those of *L. sidoides*, *L. organoides* Jatobá and *C. zehntneri* deserve special mention in the control of *S. rolfsii*, for which the fungus showed high sensitivity. These three species presented yields of, respectively, 1.38; 0.4 and; 1.20%, whose results reinforce the possibility of its *in vivo* use. None of these species has been cultivated and its use has now been made by extractivism.

In this way, the great antifungal potential of the essential oils is evident. Its broad spectrum of action encourages further studies, in order to better understand the physiology of plants, especially the factors that influence the synthesis of its compounds. The next stage should focus on the development of an industrial scale production process aiming at obtaining alternative inputs based on essential oils plant diseases control.

In summary, the results show that the chemical composition of the essential oils identified the following major constituents: thymol (*Lippia sidoides*); piperitenone oxide (*Lippia lasiocalicyna*); borneol (*Lippia organoides*); carvacrol (*Lippia organoides* - Jatobá); sabinene (*Mesosphaerum suaveolens*);  $\beta$ -sabinene (*Croton sonderianus*) and estragole (*Croton zehntneri*), being *Sclerotium rolfsii* highly sensitive to the essential oils of *Lippia sidoides*, *L. organoides* - Jatobá, and *Croton zehntneri*.

## REFERENCES

- ADANDONON A, AVELING TAS, LABUSCHAGNE N AND TAMO M, 2006. Biocontrol agents in combination with *Moringa oleifera* extract for integrated control of *Sclerotium* caused cowpea damping-off and stem rot. Eur J Plant Pathol. 115: 409-418.
- ALMEIDA AC, MORÃO RP, MARTINS ER, FONSECA FSA, SOUZA CN, PRATES JPB, OLIVEIRA FD AND SILVA LMV, 2016. Atividade antisséptica do óleo essencial de *Lippia*

*origanoides* Cham. (Alecrim-pimenta) na presença de leite bovino. *Pesqui. Vet. Bras.* 36 (9) 905-911.

ALMEIDA WS, LIMA SG, BARRETO, HM, ANDRADE LMS, FONSECA L, ATHAYDE SOBRINHO C, SANTOS ARB, MURATORI MCS, 2018. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Lippia lasiocalycina* Cham. (Verbenaceae). *Ind Crops Prod.* 125: 236–240.

ASEKUN OT, EKUNDAYO O AND ADENIVI BA. 1999. Antimicrobial activity of the essential oil of *Hyptis suaveolens* leaves. *Fitoterapia.* 70, 440–442.

ASSIS E AND SILVA FAZ. 2013. *Assistat 7.7 beta*. Campina Grande: UFCG,

ATHAYDE SOBRINHO C, VIANA FMP AND SANTOS AA. 2005. Doenças Fúngicas E Bacterianas. In: FREIRE FILHO FR, LIMA JAA AND RIBEIRO VQ. *Feijão-caupi: avanços tecnológicos*. 1 ed. Brasília: Embrapa Meio-Norte, p. 461-484.

BAKKALI F, AVERBECK S, AVERBECK D AND IDAOMAR M. 2008. Biological effects of essential oils – A review. *Food Chem Toxicol.* 46: 446–475.

BERRERA-NECHA LL, BAUTISTA-BANOS S, FLORES-MOCTEZUMA HE AND ROJAS-ESTUDILLO A. 2008. Efficacy of essential oils on the conidial germination, growth of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. and Sacc. and control of postharvest diseases in papaya (*Carica papaya* L.). *Plant Pathol J*, 7 (1): 174-178.

BARROS FMC, ZAMBARDA EO, HEINZMANN BM AND MALLMANN CA. 2009. Variabilidade sazonal e biossíntese de terpenóides presentes no óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). *Quim Nova.* 32 (4): 861-867.

BEDENDO IP. Podridões de raiz e colo. 2011. In: AMORIM L, REZENDE JAM AND BERGAMIM FILHO A. Manual de fitopatologia. Piracicaba: Agronômica Ceres. 1 (23): 443-449.

BRANQUINHO NAA. Avaliação de teor e composição química dos óleos essenciais de três espécies de *Hyptis*, submetidas a diferentes velocidades e temperaturas de secagem. 2015. 103f. Dissertação. (Agroquímica) Programa de Pós-Graduação em Agroquímica. Instituto Federal De Educação, Ciência E Tecnologia Goiano. IFGO. Rio Verde, GO.

BRUM RBCS, CASTRO HG, CARDON CH, PEREIRA AS, CARDOSO DP AND SANTOS GR. 2014. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre fungos fitopatogênicos. *Magistra*. 26 (3): 361-371.

CARDOSO JE. 1994. Podridão de colo. In: SARTORATO A AND RAVA CA. (Eds.). Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle. EMBRAPA. Brasília. 165-174.

CARVALHO RRC, LARANJEIRA D, CARVALHO FILHO JLS, SOUZA PE, BLANK AF, ALVES PB, JESUS HCR AND WARWICK DRN. 2013. In vitro activity of essential oils of *Lippia sidoides* and *Lippia gracilis* and their major chemical components against *Thielaviopsis paradoxa*, causal agent of stem bleeding in coconut palms. *Quim Nova*. 36 (2): 241-244.

COSTA ACV, MELO GFA, MADRUGA MS, COSTA JGM, GARINO JUNIOR F AND QUEIROGA NETO, V. 2013. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of a *Croton rhamnifolioides* leaves Pax & Hoffm. *Cienc. Agrar*. 34 (6): 2853-2864.

COSTA ART, AMARAL MFZJ, MARTINS PM, PAULA JAM, FIUZA TS, RESVENZOL LMF, PAULA JR AND BARA MTF. 2011. Ação do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M. Perry sobre as hifas de alguns fungos fitopatogênicos. *Rev Bras Plant Med*. 13 (2): 240-245.

COSTA JGM, RODRIGUES FFG, ANGÉLICO EC, PEREIRA CKB, SOUZA EO, CALDAS GFR, SILVA MR, SANTOS NKA, MOTA ML AND SANTOS PF. 2008. Composição química e avaliação da atividade antibacteriana e toxicidade do óleo essencial de *Croton zehntneri* (variedade estragol). Rev. Bras. Farmacogn. 18 (4): 583-586.

CRAVEIRO AA. Óleos essenciais de plantas do Nordeste. Fortaleza: Edições UFC, 1981. 209 p.

DAMASCENO EIT, SILVA JKR, ANDRADE EHA, SOUSA PJC AND MAIA JGS. 2011. Antioxidant capacity and larvicidal activity of essential oil and extracts from *Lippia grandis*. Rev. Bras. Farmacogn. 21 (1): 78-85.

EDGINGTON LV, KHEW KL AND BARTON GL. 1971. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. Phytopathology. 61 (1): 42-44.

FALCÃO DC AND MENEZES FS. Revisão etnofarmacológica, farmacológica e química do gênero *Hyptis*. 2003. Rev Bras Farmac. 84 (3): 69-74.

FONTENELLE ROS, MORAIS, SM, BRITO EHS, BRILHANTE RSN, CORDEIRO RA, NASCIMENTO, NRF, KERNTOPF, MR, SIDRIM JJC AND ROCHA MFG. 2008. Antifungal activity of essential oils of *Croton* species from the Brazilian *Caatinga* biome. J Appl Microbiol. 104: 1383–1390.

FREIRE FILHO FR, RIBEIRO VQ, ROCHA MM, SILVA KJD, NOGUEIRA MSR AND RODRIGUES EV. 2011. Feijão-caupi no Brasil: Produção, Melhoramento Genético, Avanços e Desafios. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 84p.

GOMES MS, CARDOSO MG, SOARES MJ, BATISTA LR, MACHADO SMF, ANDRADE MA, AZEREDO CMO, RESENDE JMV AND RODRIGUES LMA. 2014. Use of essential oils of the genus *Citrus* as biocidal agents. Amer J Plant Scienc. 5: 299-305.

GONÇALVES AH, PEREIRA AS, SANTOS GRS AND GUIMARÃES LGL. Atividade fungitóxica in vitro dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* Cham., *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf. e de seus constituintes majoritários no controle de *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii*. 2015. Rev Bras Plan Med, Campinas, v.17, n.4, supl. III: 1007-1015.

GUIMARÃES LGL, CARDOSO MG, SOUZA RM, ZACARONI MB AND SANTOS GR. 2014. Óleo essencial de *Lippia sidoides* nativas de Minas Gerais: composição, estruturas secretoras e atividade antibacteriana. Rev Cien Agron. 45 (2): 267-275.

KOKUB D, AZAM F, HASSAN A, ANSAR M, ASAD MJ AND KHANUM A. 2007. Comparative growth, morphological and molecular characterization of indigenous *Sclerotium rolfsii* strains isolated from different locations of Pakistan. Pak J Bot. 5 (39): 1849-1866.

LEMOS TLG, MATOS FJA, ALENCAR JW, CRAVEIRO AA, CLARK AM AND MCCHESENEY JD. 1990. Antimicrobial activity of essential oils of Brazilian plants. Phytother Res. 4 (2): 82-84.

LILLY VG AND BARNETT HL. 1951. Physiology of the fungi. New York: McGraw-Hill. 561p.

LORENZI H AND MATOS FJA. 2002. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas. Ed:Nova Odessa, São Paulo. Instituto Plantarum. 512p.

MALELE RS, MUTAYABARWA CK, MWANGI JW, THOITHI GN, LOPEZ AG, LUCINI EI AND ZYGADLO JA. 2003. Essential oil of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. from Tanzania: composition and antifungal activity. J Essent Oil Res. 15 (6): 438-440.

MARTINS FT, SANTOS MH, POLO M AND BARBOSA LCA. 2006. Variação química do óleo essencial de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit., sob condições de cultivo. Quim Nova. 29 (6): 1203-1209.



MATOS, FJA. 1997. As plantas da farmácia viva. Fortaleza: Universidade Federal do Ceara. 57p.

MORÃO RP, ALMEIDA AC, MARTINS ER, PRATES JPB AND OLIVEIRA FD. 2016. Constituintes químicos e princípios farmacológicos do óleo essencial de alecrim pimenta (*Lippia organoides*) Mont Clar. 18 (1): 74 – 81.

OLIVEIRA ARMF. Morfoanatomia, composição química e atividade biológica do óleo essencial de espécies nativas de *Lippia*. 2014. 114f. Tese (Recursos Genéticos Vegetais) Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. Universidade Estadual de Feira de Santana. UEFS. Feira de Santana, BA.

PACHECO KR, VISCARDI BSM, VASCONCELOS TMM, MOREIRA GAM, VALE HMM AND BLUM LEB. 2016. Efficacy of *Trichoderma asperellum*, *T. harzianum*, *T. longibrachiatum* and *T. reesei* against *Sclerotium rolfsii*. Biosc J, 32 (2): 412-421.

PEIXINHO GS, SANTOS CMG, RIBEIRO VG, AMORIM EPR, CARVALHO VN AND BISPO JS. 2017. Extratos de Aroeira, Angico, Umburana e Quebra-faca no controle de *Lasiodiplodia theobromae* em cachos da videira cv. Itália. Summa Phytopathol. 43 (2): 158-160.

PUNJA ZK, HUANG JS AND JENKINS SF. 1985. Relationship of mycelial growth and production of acid oxalic and wall cell degrading enzymes to virulence in *Sclerotium rolfsii*, Canad J Plant Pathol. 7: 109-117.

QUEIROZ MRA, ALMEIDA AC, ANDRADE VA, LIMA TS, MARTINS ER, FIGUEIREDO LS AND CARELI RT. 2014. Avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial de *Lippia organoides* frente à *Staphylococcus* sp. isolados de alimentos de origem animal. Rev Bras Plantas Med. 16 (3): 737-743.

REIS EM, FORCELINI CA AND REIS AC. 2007. Manual de fungicidas: guia para o controle de doenças de plantas. Passo Fundo: UPF.

RODRIGUES EA, SCHWAN-ESTRADA KRF, STANGARLIN JR, SCAPIM CA AND FIORI-TUTIDA ACG. 2006. Potencial da planta medicinal *Ocimum gratissimum* no controle de *Bipolaris sorokiniana* em sementes de trigo. Acta Scienti Agron. 28 (2): 213-20.

SALES JÚNIOR R, MEDEIROS EV, ANDRADE DEGT, PERUCH LAM AND RODRIGUES VJLB. 2005. Controle químico de doenças radiculares. In: MICHEREFF SJ, ANDRADE DEGT AND MENEZES M. Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco. p. 345-366.

SANGWAN NS, FAROOQI AHA, SHABIH F AND SANGWAN RS. 2001. Regulation of essential oil production in plants. Plant Growth Reg. 34 (1): 3-21.

SARRAZIN SLF, SILVA LA, ASSUNÇÃO APF, OLIVEIRA RB, CALAO VYP, SILVA R, STASHENKO EE, MAIA JGS AND MOURÃO RHV. 2015. Antimicrobial and Seasonal Evaluation of the Carvacrol-Chemotype Oil from *Lippia origanoides* Kunth. J Molecul. 20: 1860-1871.

SELLAMUTHU PS, SIVAKUMAR D AND SOUNDY P. 2013. Antifungal activity and chemical composition of thyme, peppermint and citronella oils in vapor phase against avocado and peach postharvest pathogens. J Food Safet. 33: 86–93.

SILVA JA, OLIVEIRA MG, SOUZA LT, ASSUNÇÃO IP, LIMA GA AND MICHEREFF SJ. 2014. Reação de genótipos de feijão-fava a *Sclerotium rolfsii*. Hort Bras. 32 (1): 98-101.

SILVA AF, BARBOSA LCA, SILVA EAM, CASALI VWD, NASCIMENTO EA. 2003. Composição química do óleo essencial de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. (Lamiaceae). Rev Bras Plant Med. 6 (1): 1-7.

SINGH BB, EHLERS JD, SHARMA B, FREIRE FILHO FR. 2002. Recent Progress In Cowpea breeding. In: FATOKUN CA, TARAWALI SA, SINGH BB, KORMAWA PM, TAMO M. (Eds). Challenges and opportunities for enhancing sustainable cowpea production. Ibadan: IITA, p. 22-40.

SINGH SR, ALLEN DJ. 1979. Cowpea pests and diseases. Ibadan: International Institute of Tropical Agriculture, 85 p.

TEIXEIRA ML. Óleos essenciais de *Lippia origanoides* Kunth. e *Mentha spicata* L.: composição química, potencialidades biológicas e caracterização das estruturas secretoras. 2013. 123f. Dissertação (Agroquímica) Programa de Pós-Graduação em Agroquímica. Universidade Federal de Lavras. UFLA. Lavras, MG.

TONIN MFB, AVELINE A, DANELLI ALD, REIS EM, ZOLDAN SM, GARCÉS-FIALLOS FR. 2013. *In vitro* mycelial sensitivity of *Macrophomina phaseolina* to fungicides. Pesq Agrop Trop. 43 (4): 460-466.

VELOSO RA, CASTRO HG, CARDOSO DP, SANTOS GR, BARBOSA LCA, SILVA KP. 2012. Composição e fungitoxicidade do óleo essencial de capim citronela em função da adubação orgânica. Pesq Agrop Bras.47 (12): 1707-1713.

VIDAL CS, OLIVEIRA-TINTINO CDM, TINTINOS SR, GALVAO HBF, COSTA JGM, COUTINHO HDM, MENEZES IRA. 2016. Chemical composition, antibacterial and modulatory action of the essential oil of *Croton rhamnifolioides* leaves Pax and Hoffman. Biosc J. 32 (6): 1632-1643.

WANG X, LIU W, XIN C, ZHENG Y, CHENG Y, SUN S, LI R, ZHU X, DAI SY, RENTZEPIS PM, YUAN JS, 2016. Enhanced limonene production in cyanobacteria reveals photosynthesis limitations. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 113 (50): 14225-14230.

ZOLLO-AMVAM PH, BIVITI L, TCHOUMBOUGNANG F, MENUT C, LAMATY G, BOUCHET P. 1998. Aromatic plants of tropical Central Africa. Part XXXII. Chemical composition and antifungal activity of thirteen essential oils from aromatic plants of Cameroon. *Flav Frag J.* 13 (2): 107–114.

## Capítulo III

---

### **Óleos essenciais em tratamento de sementes no controle de *Sclerotium rolfsii* Sacc em feijão-caupi e seu efeito na germinação das sementes**

**Óleos essenciais para tratamento de sementes no controle de *Sclerotium rolfsii* Sacc em feijão-caupi e seu efeito na germinação das sementes**

Ananda Rosa Beserra Santos<sup>1</sup>, Larisse Raquel Carvalho Dias<sup>2</sup>, Edymilais da Silva Sousa<sup>3</sup>, Christian Dário Silva de Melo<sup>3</sup>, Sidney Gonçalo de Lima<sup>3</sup>, Paulo Henrique Soares da Silva<sup>4</sup>,  
Delson Laranjeira<sup>1</sup>, Candido Athayde Sobrinho<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Agricultura, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s / n, 52171-900 Recife - PE, Brasil

<sup>2</sup> Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual do Maranhão, Cidade Universitária Paulo VI, S / N, 65055-310, São Luís, MA, Brasil

<sup>3</sup> Laboratório de Geoquímica Orgânica, Universidade Federal do Piauí, 64049-550, Bairro Ininga - PI, Brazil.

<sup>4</sup> Embrapa Meio-Norte, 64008-780 - Teresina - PI, Brazil

\*E-mail: candido.athayde@embrapa.br

**RESUMO**

O uso de óleos essenciais constituiu uma alternativa aos agroquímicos convencionais para controle de doenças em plantas. Assim, objetivou-se identificar a constituição química dos óleos essenciais de *Lippia sidoides*, *Lippia origanoides* e *Croton zehntneri* e avaliar sua eficiência no controle de *Sclerotium rolfsii*, agente da murcha de esclerócio do feijão-caupi *in vitro* e *in vivo* e, o efeito dos mesmos sobre a germinação das sementes, quando empregado o controle *in vivo*. Os experimentos em triplicata, conduzidos em laboratório e em vasos em casa-de-vegetação foram organizados em delineamento inteiramente casualizado, sendo empregadas cinco concentrações (0.5; 1.0; 2.0; 4.0 e; 8.0 ml/kg de semente) com quatro repetições. Os ensaios *in vitro* foram conduzidos em placas de Petri com meio de cultura BDA (Batata-Dextrose-Ágar) e em vasos, com solo infestado, avaliou-se a condição *in vivo*. O efeito do

tratamento sobre a germinação das sementes foi obtido utilizando-se o teste de germinação padrão com rolo de papel. A composição química dos óleos essenciais revelou como constituintes majoritários o timol para *L. sidoides*, o carvacrol para *L. origanoides* e o estragol para *C. zehntneri*. O fungo *S. rolfsii* mostrou-se sensível a todos os óleos avaliados, *in vitro* e *in vivo*, sendo o controle mais efetivo pelos óleos de *L. sidoides* e *L. origanoides*. O emprego do tratamento de sementes com os óleos essenciais é efetivo no controle de *S. rolfsii* na concentração de 4,0 ml kg<sup>-1</sup>. Concentrações maiores, apesar de apresentarem excelentes níveis de controle, interferem negativamente na germinação das sementes de feijão-caupi.

**Palavras-chave:** Controle alternativo, Crescimento micelial, Doenças de plantas

## 1. Introdução

O feijão caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) é uma leguminosa muito plantada e consumida nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, sendo utilizado para o consumo humano como importante fonte de proteína, energia, fibras e minerais, além de ser usado também como matéria-prima para adubação verde e material orgânico (Manaf; Zayed, 2015; Pereira et al., 2016a).

A cultura do feijão-caupi pode ser afetada por diversas doenças, entre elas a murcha de esclerócio, caracterizada por apresentar um emaranhado de micélio de coloração branca e, sob este, uma intensa desestruturação do tecido vegetal parasitado (Athayde Sobrinho; Viana; Santos, 2005), levando à redução do estande e refletindo diretamente no rendimento de grãos (Cardoso, 1994).

A escassez de variedades resistentes para a murcha de esclerócio tem requerido a busca por medidas integradas de manejo que promovam o desenvolvimento das plantas, em detrimento do patógeno, tais como o uso de rotação de culturas, a fuga às altas densidades de plantio, o tratamento biológico e químico (Bedendo, 2011), sendo esta última medida a mais adotada (Menten, 1995). Há poucas informações de alternativas ao uso de produtos

convencionais, entre elas, o emprego de óleos essenciais de plantas que tem demonstrado elevado potencial no controle de pragas e doenças (Bozik et al., 2017; Girardi et al., 2017). Entretanto, são escassos os trabalhos que tratam sobre o manejo de doenças causadas por patógenos habitantes do solo com o uso de óleos essenciais, sobretudo, quando se busca empregar o tratamento de sementes como estratégia de manejo. Nesta perspectiva, não foi encontrado na literatura corrente nenhum trabalho relacionado.

É incontestável que o tratamento de sementes, no âmbito do controle integrado de doenças de plantas, representa uma das principais medidas, pela simplicidade de execução, baixo custo e elevada eficácia sob muitos aspectos (Machado, 2000).

Os estudos relacionados ao emprego dos óleos essenciais fundamentam-se em informações de que nas plantas, vários compostos secundários, alguns dos quais entram na constituição dos óleos, representam meios naturais de defesa, por agirem na proteção contra predadores e patógenos e até como herbicidas (Sodaeizadeh et al., 2010). Assim, têm sido avaliados quanto sua atuação como fungicidas, inseticidas e nematicidas. Alguns resultados têm se mostrado promissores na obtenção de biocidas naturais, quer como extratos brutos, quer como óleos essenciais (Morais, 2009).

A propriedade antimicrobiana e ação fungitóxica comprovadas, em óleos essenciais destacam-se como alternativa em substituição à aplicação de produtos químicos sintéticos, podendo ser empregados com sucesso no controle de fungos fitopatogênicos (Santos et al., 2008; Gomes et al., 2016; Dias et al., 2019). O timol e o carvacrol são exemplos de constituintes encontrados em óleos essenciais apontados como moléculas promissoras no estudo de alternativas terapêuticas para o tratamento antimicrobiano (Bakkali et al., 2008; Özkan et al., 2011; Veras et al., 2013).

Apesar de crescentes as informações, ainda existem vazios em relação ao uso de óleos essenciais e seu potencial emprego no manejo de patossistemas de muitas culturas, como o feijão-caupi. Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo identificar a constituição



química dos óleos essenciais de *Lippia sidoides*, *Lippia origanoides* e *Croton zehntneri*, avaliar a eficiência dos óleos no controle da murcha de esclerócio em feijão-caupi *in vitro* e *in vivo*, tendo como veículo sementes de feijão caupi. Adicionalmente, avaliou-se o efeito dos óleos sobre a germinação das sementes, quando empregado o controle *in vivo*.

## **2. Material e Métodos**

Os experimentos relacionados às análises fitopatológicas foram conduzidos em casa de vegetação e Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Meio-Norte. As análises químicas foram realizadas no Laboratório de Geoquímica Orgânica na Universidade Federal do Piauí. Todos os ensaios foram realizados em triplicada utilizando o fungo *S. rolfsii* coletado a partir da região do colo de plantas com sintomas da doença e depositado na Coleção de Fungos de Solo da Universidade Federal Rural de Pernambuco sob o número CFS 614.

### **2.1 Obtenção e análise química da composição dos óleos essenciais**

Foram utilizados óleos essenciais de *Lippia sidoides*, *Lippia origanoides* e *Croton zehntneri*. As folhas de *L. sidoides* foram coletadas em Teresina e após identificação botânica, a exsicata foi depositada no Herbário Graziela Barroso sob o voucher TEPB 18743. As folhas de *L. origanoides* foram coletadas em Jatobá do Piauí registrada sob o número CESJ 70120 no Herbário Leopoldo Krieger e as de *C. zehntneri* foram coletadas em Valença do Piauí, PI e registrada no Herbário Graziela Barroso sob o voucher TEPB 30944. A pesquisa com estas espécies está cadastrada no SISGEN processo nº AFE8A1E.

A extração dos óleos essenciais foi realizada utilizando-se o método de hidrodestilação, em aparelho de Clevenger, acoplado a manta aquecedora, como fonte de calor para o sistema (GOMES et al., 2014). Em cada extração foram utilizados 200g de folhas desidratadas em temperatura ambiente em bancada de laboratório e previamente trituradas.

A análise de CG-EM foram realizadas no cromatógrafo (GCMS-QP2010 SE, AOC-5000 auto injetor da SHIMADZU), seguindo as seguintes condições de análise: injetor 250°C,

e temperatura inicial do forno de 60 °C, apresentando uma rampa de aquecimento 3 °C por mim até 240 °C permanecendo por 10 minutos, razão Split de 1:100, temperatura da interface 350 °C e fonte de 250 °C, faixa de massa de 40 a 600 Daltons, ionização por impactos de elétrons, 70 eV. Para cromatografia dos componentes foi empregada uma coluna Rxi-5HT, 30 m × 0,25 mm, espessura do filme interno de 0,10 μm com fase estacionária de difenil dimetilpolissiloxano e Hélio como gás carreador. A identificação dos constituintes foi feita por comparação das ordens de eluição, com dados da Literatura.

## 2.2 Efeito *in vitro* do tratamento de sementes com os óleos essenciais

Neste ensaio, considerado piloto e submetido a rigoroso controle de laboratório, foram utilizadas sementes de feijão-caupi da cultivar BRS Tumucumaque, cedidas pelo Programa de Melhoramento da Embrapa Meio-Norte. Utilizaram-se placas de Petri de 90 mm de diâmetro com meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar) no centro das quais foram colocados discos de micélio de *S. rolfsii* rodeados de quatro sementes tratadas, conforme as concentrações 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e; 8,0 ml kg de semente<sup>-1</sup> e postas equidistantemente do centro, a 4 mm das bordas das placas (Figura 1). As sementes foram tratadas com o óleo em tubos de ensaio (15 x 100 mm), agitando-se por três minutos em agitador tipo vortex, de forma a garantir a distribuição uniforme do óleo sobre as sementes, as quais foram mantidas vedadas com filme plástico (parafilm), sendo as sementes deixadas em repouso "overnight".



**Figura 1.** Detalhe da unidade experimental mostrando a distribuição radial das sementes de

feijão-caupi BRS Tumucumaque em relação ao inóculo.

O ensaio ocorreu em um delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial 3 x 5 com três repetições. A avaliação do crescimento micelial foi realizada cinco dias após a instalação do experimento, quando este atingiu as sementes em pelo menos uma das placas e foi obtido pela medida do diâmetro da colônia em dois sentidos diametralmente opostos.

Os dados de crescimento micelial foram submetidos a análise de variância, sendo o efeito das concentrações avaliado por análise de regressão linear e o efeito dos óleos comparados por Tukey a 5% de probabilidade. Para tanto, empregou-se o programa estatístico Sistema de Análise de Variância para Dados Balanceados – SISVAR, segundo Ferreira (2011).

### **2.3 Efeito *in vivo* do tratamento de sementes com os óleos essenciais sobre *Sclerotium rolfsii***

Na avaliação *in vivo*, as sementes, igualmente tratadas, foram semeadas, quatro por vaso, em vasos plásticos de 1,5 litros, com solo contendo areia vegetal e casca de arroz carbonizada (3:1) previamente esterilizado em autoclave e infestado com *S. rolfsii*. A infestação do solo foi realizada a partir da deposição de um grão de arroz com casca autoclavado colonizado no centro do vaso e em torno do qual, dispostas as sementes tratadas com os óleos essenciais nas respectivas concentrações.

O ensaio foi organizado em um delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial 3 x 5 (óleos e concentrações) com cinco repetições. Foram avaliadas as seguintes concentrações: 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e; 8,0 ml/ kg de semente<sup>-1</sup> e um controle (sem óleo). Os vasos foram irrigados diariamente e as avaliações de incidência, realizadas diariamente durante 15 dias, consistiu na contagem das plantas com sintomas de necrose, constrição no colo e morte das plântulas devido ao ataque do fungo (Figura 2).



**Figura 2.** Padrão sintomatológico de referência usado na avaliação da incidência da murcha de esclerócio em feijão-caupi. Teresina, PI, 2018.

Os resultados analisados foram submetidos a análise de variância, sendo o efeito das concentrações avaliado por análise de regressão linear e as médias dos dados obtidos para os óleos foram comparadas entre si utilizando-se o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Para tanto, empregou-se o programa estatístico Sistema de Análise de Variância para Dados Balanceados – SISVAR, segundo Ferreira (2011).

#### **2.4 Efeito do óleo sobre a germinação das sementes**

Definida a concentração para uso nas sementes, realizou-se o teste de germinação visando avaliar possível efeito fitotóxico ou alelopático causado pelos óleos testados em duas concentrações (4 e 8 mL Kg de semente<sup>-1</sup>) e um controle (sem óleo). O óleo foi aplicado sobre as sementes em tubos de ensaio, agitando-se por três minutos em agitador tipo vortex, a fim de otimizar a distribuição dos óleos nas sementes. Em seguida os tubos de ensaio vedados com filme plástico (parafilm) e as sementes foram mantidas em repouso "overnight" em condições ambientes de laboratório.

Para avaliação da influência do óleo na semente, utilizou-se o Teste de Germinação padrão (BRASIL, 2009), sendo o efeito dos tratamentos comparados por análise de variância e as médias das percentagens de germinação pelo teste de Tukey a 5% de significância, em um delineamento inteiramente casualizado, com quatro tratamentos (óleo de *L. sidoides*, *L.*

*origanoides* e *C. zehntneri* e a testemunha sem óleo) e oito repetições. Em todas as avaliações foi utilizado o programa estatístico Sistema de Análise de Variância para Dados Balanceados – SISVAR, segundo Ferreira (2011).

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1 Análise da composição química dos óleos

Foram identificados 38 compostos nos óleos avaliados, obtidos por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM), sendo identificados 95,9% em *L. sidoides* e 100% em *L. organoides* e *C. zehntneri*. Considerando cada espécie, os constituintes majoritários foram timol (*L. sidoides*); carvacrol (*L. organoides*) e estragol (*C. zehntneri*) (Tabela 1) corroborando com Costa et al. (2008); Carvalho et al. (2013) e Morão et al. (2016).

Tabela 1.

Índice de retenção (RI) e composição química dos óleos essenciais das folhas de *Lippia sidoides* (*Ls*), *Lippia organoides* (*Lo*), e *Croton zehntneri* (*Cz*).

IR <sup>a</sup>	IR <sup>b</sup>	Composto	<i>Ls</i>	<i>Lo</i>	<i>Cz</i>
850	866	Z-3-HEXANEOL	0,5	-	-
924	921	$\alpha$ -THUJENE	1,1	1,1	-
932	928	$\alpha$ -PINENE	0,5	0,3	-
969	967	SABINENE	-	-	0,2
974	971	OCTEN-3-OL	0,7	-	-
988	984	$\beta$ -MYRCENE	2,2	2,0	-
1002	1001	$\alpha$ -PHELLANDRENE		0,1	-
1014	1011	$\alpha$ -TERPINENE	1,6	1,7	-
1020	1019	PARA-CYMENE	13,1	13,3	-
1024	1023	LIMONENE	0,8	0,4	-
1026	1025	1,8-CINEOLE	2,3	0,2	2,9

1032	1030	Z-OCIMENE	0,2	-	-
1044	1040	E- $\beta$ -OCIMENE	-	-	0,6
1054	1052	$\gamma$ -TERPINENE	4,3	7,8	-
1065	1060	Z SABINENE HIDRATE	0,4	-	-
1095	1093	LINALOOL	0,6	-	-
1174	1172	4-TERPINEOL	1,6	0,8	-
1186	1185	$\alpha$ -TERPINEOL	0,8	-	0,8
1195	1195	ESTRAGOL		-	90,1
1232	1229	THYMOL METHYL ETHER	2,8	5,5	-
1241	1239	CARVACROL, METHYL ETHER	-	0,4	-
1289	1290	THYMOL	33,2	3,0	-
1298	1297	CARVACROL	0,6	54,4	-
1349	1348	THYMOL ACETATE	0,3	0,5	-
1366	1366	PIPERITENONE OXIDE	-	-	-
1374	1370	$\alpha$ -COPAENE	-	0,6	-
1417	1414	TRANS-CARYOPHYLLENE	17,4	4,0	2,1
1432	1430	$\alpha$ -BERGAMOTENE		0,3	-
1439	1433	AROMADENDRENE	1,2	-	-
1452	1448	$\alpha$ -HUMULENE	0,9	0,1	-
1484	1476	GERMACRENE-D	1,1	-	-
1489	1481	$\beta$ -SABINENO	-	0,8	-
1494	1491	BICICLOGERMACRENE	2,8	-	-
1496	1488	VALENCENE	-	1,6	-
1500	1491	BICYCLOGERMACRENE	-	-	3,3
1522	1518	$\delta$ -CADINENE	0,4	0,6	-

1577	1573	SPATHULENOL	0,8	0,3	-
1582	1578	CARYOPHILLENE OXIDE	3,7	0,4	-

IR<sup>a</sup>: índice de retenção relativo, calculado pela equação de Van den dool. %: Porcentagem de compostos. Os compostos listados nesta tabela estão em ordem crescente de eluição em coluna Rxi-5HT, 30m × 0,25mm. IR<sup>b</sup>: índices de retenção experimentais.

A variabilidade na composição química de cada óleo pode ser de extrema importância para sua efetiva ação, uma vez que a atividade antimicrobiana está diretamente relacionada ao sinergismo de sua composição química, onde compostos como álcoois, fenóis, terpenos e cetonas são apontados como os principais responsáveis pelas propriedades tóxicas (Sellamuthu et al., 2013). Os terpenos (Tabela 2), metabólitos secundários mais produzidos pelas plantas, têm aplicações nos mais variados setores, como nas indústrias farmacêutica e de solventes (Wang et al., 2016).

Tabela 2.

Percentual de constituintes químicos agrupados dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* (Ls), *Lippia origanoides* (Lo) e *Croton zehntneri* (Cz).

Componentes agrupados	%		
	<i>Ls</i>	<i>Lo</i>	<i>Cz</i>
Monoterpenos hidrocarbonetos	57,25	26,52	0,84
Monoterpenos oxigenados	10,39	64,75	93,75
Sesquiterpenos hidrocarbonetos	23,94	8	5,41
Sesquiterpenos oxigenados	4,55	0,73	v
Outros	0,48	v	v
Não identificado	3,39	v	v

v: vestigial (<0,05%)

O timol e o carvacrol apresentaram-se em maior quantidade no gênero *Lippia*. O óleo de *L. sidoides* apresentou 33,5% de timol e 0,6% de carvacrol, enquanto o óleo de *L.*

*origanoides* apresentou 3,0% de timol e 54,4% de carvacrol. Esses dados são compatíveis com os encontrados por outros autores (Craveiro, 1981; Teixeira, 2013). Para eles, os principais constituintes voláteis frequentemente encontrados nos óleos essenciais de diferentes espécies de *Lippia* são o timol, carvacrol, 1,8- cineol, limoneno, *p*-cimeno, linalol,  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -cariofileno.

O óleo essencial de *L. sidoides*, em especial, tem demonstrado propriedades de interesse epidemiológico. O principal constituinte do óleo dessa espécie encontrado neste trabalho, o timol, foi descrito como potente anti-séptico do grupo fenol, com destacada atividade bactericida e fungicida (Lemos et al., 1990). Ao carvacrol, principal constituinte do óleo de *L. origanoides*, foram atribuídas atividades anti-microbianas (Lorenzi; Matos, 2002; Queiroz et al., 2014).

O óleo de *C. zehntneri* apresentou como constituinte majoritário o estragol (90,9%), corroborando com Costa et al. (2008), Fontenelle et al. (2008) e Aguiar et al. (2014) que identificaram, respectivamente, 76,8, 72,9 e 99,15% de estragol como constituinte majoritário. Os dois primeiros autores provaram ainda, que o óleo essencial de *C. zehntneri* tem ação tóxica contra *Shigella flexneri* e *Microsporium canis*, respectivamente, encorajando pesquisas no controle de fungos fitoparasitas com o mesmo óleo.

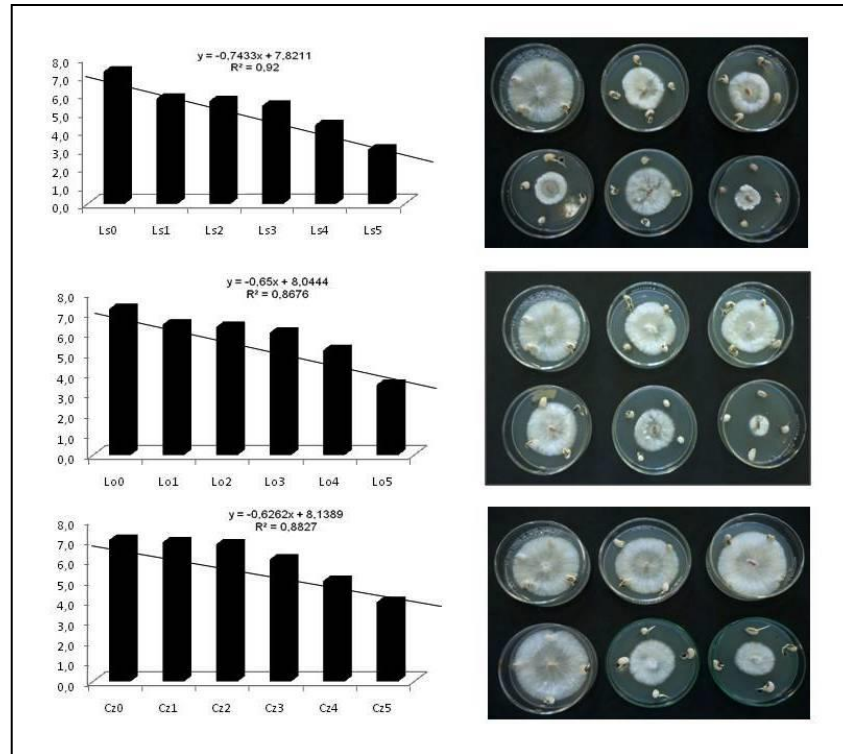
### **3.2 Efeito *in vitro* do tratamento de sementes com os óleos essenciais sobre *S. rolfsii***

Ao avaliar os dados sobre o efeito do tratamento de sementes com os óleos essenciais *in vitro*, foi possível verificar que todos os óleos reduziram significativamente o crescimento micelial de *S. rolfsii*, à medida do aumento das concentrações, cujo modelo ajustou-se a um padrão linear decrescente (Figura 3). Este resultado vem confirmar observações de alguns autores quando destacam que a incidência de doenças tende a diminuir na presença de óleos essenciais devido a existência de propriedades bioativas, especialmente sua ação antimicrobiana (Damasceno et al., 2011; Carvalho et al., 2013; Guimarães et al., 2014).

Há trabalhos que comprovam a redução da incidência de diferentes patógenos nas



sementes (Gomes et al., 2016; Pereira et al., 2016b), mas ainda são poucos os que apresentam a semente como veículo de protetores naturais semelhantes aos óleos essenciais.



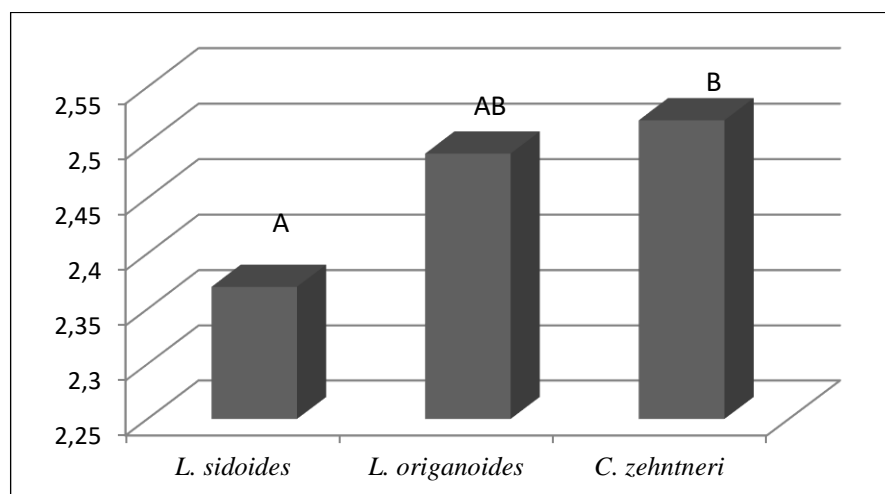
**Figura 3.** Efeito *in vitro* sobre o crescimento micelial de *Sclerotium rolfsii* em meio BDA contendo sementes tratadas com óleo essencial de *Lippia sidoides* (Ls), *Lippia origanoides* (Lo), e *Croton zehntneri* (Cz) em cinco concentrações (ml/kg de sementes). À direita, placas de Petri, mostrando o comportamento do fungo quando submetido aos óleos essenciais nas diferentes concentrações. Crescimento micelial em cm (eixo y), concentração (eixo x). Teresina, PI, 2018.

Nesse contexto, Pereira et al. (2016b) observaram que a utilização dos óleos essenciais de citronela (*Cymbopogon nardus*) e menta (*Mentha piperita*) reduziu a incidência dos diferentes patógenos presentes nas sementes de *Schinus molle* e o óleo essencial de eucalipto (*Eucalyptus globulus*) foi eficiente para incrementar o crescimento das mudas de *S. molle*. Daronco et al. (2015) comprovaram eficácia ação antifúngica dos óleos essenciais de *Cymbopogon flexuosus* Stapf, *Eucalyptus globulus* Labill. e *Baccharis trimera* (Less) DC.

sobre a incidência de *Fusarium* sp. em sementes de soja, bem como sobre o teor de micotoxinas. Conforme os autores, os óleos essenciais mostram eficácia na redução de patógenos na semente de soja, e algumas amostras tratadas apresentaram melhor rendimento de grãos. Isto demonstra a necessidade de mais estudos correlacionando interações entre os constituintes do óleo e sua atividade biocida e fisiológica. O mesmo deve ser considerado quanto ao seu aproveitamento no tratamento de sementes, abrindo assim novas possibilidades de uso.

Por outro lado, parece provável que elevadas concentrações ou mesmo o tempo de exposição das sementes ao óleo essencial possa provocar danos, quando aplicado diretamente nas sementes interferindo nos mecanismos fisiológicos ou impedindo a germinação (Hillen et al. 2012), o que irá requerer especial atenção no momento do seu emprego.

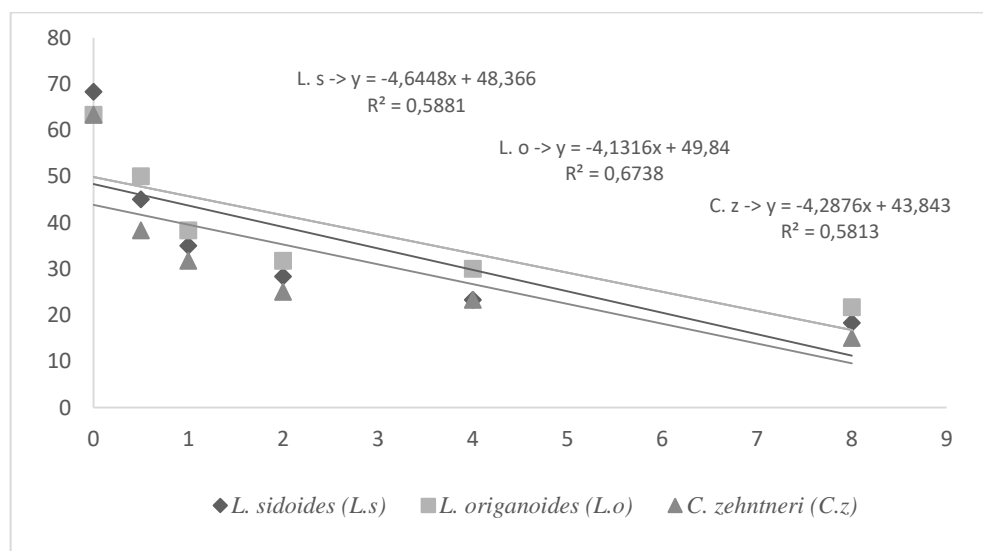
Considerando o crescimento micelial de *S. rolfssi* observou-se que na concentração 8,0 ml kg de semente<sup>-1</sup>, os óleos de *L. sidoides*, *L. origanoides* e *C. zehntneri* reduziram 61,5, 67,2 e 40% respectivamente. Quando comparados entre si, foi possível constatar que o óleo de *L. origanoides* mostrou-se semelhante aos óleos de *L. sidoides* e de *C. zehntneri*. Este, por sua vez, mostrou-se inferior ( $P < 0,05$ ) ao óleo de *L. sidoides* (Figura 4).



**Figura 4** - Crescimento micelial *in vitro* de *Sclerotium rolfii* após tratamento sementes com óleo essencial. Crescimento micelial em cm (eixo y), óleo avaliado (eixo x). Teresina, PI, 2018.

### 3.2 Efeito *in vivo* do tratamento de sementes com óleos essenciais sobre *Sclerotium rolfii*

Os resultados dos ensaios *in vivo* indicam que todos os óleos apresentaram efeito significativo ( $P < 0,01$ ) no controle do fungo com expressiva diferença ( $P < 0,01$ ) para doses, cujo comportamento obedece a um modelo linear decrescente à medida do aumento das concentrações dos óleos estudados (Figura 5). Por outro lado, não foram observadas diferenças em relação ao efeito da variável óleo, nem para interação óleo x concentrações.



**Figura 5** - Efeito *in vivo* do tratamento de sementes com óleos essenciais sobre a incidência de *Sclerotium rolfii*. Incidência (eixo y), concentração (eixo x). Teresina, PI, 2018.

A existência de trabalhos que relacionem tratamento de sementes, à base de óleos essenciais, como estratégia de manejo de fungos de solo é bastante escassa. Hillen et al (2012) verificaram o efeito dos óleos essenciais de *Eremanthus erythropappus* (candeia), *Cymbopogon martinii* (palmarosa) e de *Rosmarinus officinalis* (alecrim) no tratamento de sementes de milho, soja e feijão observando que, o óleo de alecrim proporcionou os menores percentuais de sementes assintomáticas germinadas de feijão (56,25%) e de milho (53,50%) enquanto que, a

menor percentagem de sementes assintomáticas germinadas de soja (0,00%) foi obtida quando se utilizou o óleo essencial de palmarosa.

Lobato et al. (2007) estudaram o efeito do óleo essencial de *Piper aduncum* L. em diferentes concentrações no controle de *Macrophomina phaseolina*, o qual contribui para a deterioração das sementes de caupi. Os resultados mostraram redução na ocorrência de fitopatógenos de 84% para 16% devido ao tratamento na concentração de 0,5% do óleo essencial.

Estes resultados são discrepantes daqueles obtidos na situação *in vitro*, os quais revelaram efeitos significativos também para óleos, conforme demonstrado na Figura 3. Provavelmente, tal comportamento tenha ocorrido porque na condição *in vivo* com os trabalhos sendo conduzidos no solo, onde existem multifatores interagindo, possa ter dificultado a diferenciação dos efeitos entre os óleos. Respostas semelhantes têm sido experimentadas em relação aos fungicidas. Mertz et al. (2009) avaliaram a eficácia do tratamento de sementes de soja com bioprotetores e fungicidas químicos na sanidade de sementes e emergência de plantas em laboratório, casa de vegetação e em campo. Os autores constataram que os fungicidas químicos garantem um estande adequado de plantas em comparação ao controle alternativo e que, em condições laboratoriais, os resultados foram mais expressivos.

Na literatura consultada não foram encontrados trabalhos relacionados com a ação de óleos essenciais, aplicados em tratamento de sementes, no controle de patógenos de solo, notadamente sobre o fungo *S. rolfsii*. Esta é, portanto, a primeira observação nesse sentido. Como pode ser observado, o controle de *S. rolfsii* no solo, por meio da aplicação dos óleos essenciais via tratamento de sementes, revelaram resultados bastante promissores, necessitando de mais estudos.

Por não haver paralelo na literatura de forma a permitir comparações, provavelmente o efeito dos óleos no patossistema murcha de esclerócio-feijão-caupi possa ser explicado pela capacidade protetiva que os óleos emprestaram às sementes, condicionando, no seu entorno,

um ambiente desfavorável ao estabelecimento das relações patógeno-hospedeiro, pela interposição de uma barreira efetiva entre os tecidos do hospedeiro e o inóculo do patógeno estabelecido na área ou região de cultivo (Machado, 2000). Semelhante ao que ocorre com o tratamento convencional à base de fungicidas, dentre as práticas recomendadas para o controle de doenças ocasionadas por fungos habitantes de solo, o tratamento de sementes é a tecnologia mais empregada e eficiente, o que a torna uma ferramenta estratégica dentro do contexto do manejo integrado de doenças (Goulart, 2007). Conforme Henning et al., (2010), além de controlar patógenos importantes transmitidos pela semente, o tratamento de sementes é uma prática eficiente para assegurar populações adequadas de plantas, quando as condições de solo e clima, durante a semeadura, são desfavoráveis à germinação e à rápida emergência.

### **3.3 Efeito do óleo sobre a germinação das sementes**

Conforme demonstrado na Tabela 3, foi possível verificar ação fitotóxica significativa ( $P < 0,01$ ) dos três óleos essenciais testados sobre a germinação das sementes. De uma maneira geral, a redução da percentagem de germinação ocorreu nas maiores concentrações, sendo verificados os menores valores na concentração de  $8 \text{ mL kg}^{-1}$  para os óleos de *L. origanoides* e *L. sidoides*, respectivamente.

Estes resultados estão de acordo com os de Nagao et al. (2002) que observaram a inibição do processo germinativo de sementes de alface, proporcionalmente ao aumento das concentrações do óleo essencial de *L. sidoides*. Este efeito pode estar relacionado com a alta concentração do óleo, ou a algum composto ou substância presente no mesmo capaz de impedir o processo de germinação, visto que entre os constituintes dos óleos essenciais estudados é possível observar a presença de compostos comprovadamente alelopáticos, como os terpenóides geraniol, limoneno,  $\beta$ -ocimeno, linalol, geranil acetato e  $\beta$ -cariofileno (Rao et al., 2001; Khanuja et al., 2005).

Tabela 3.

Percentagem de germinação de sementes de feijão-caupi cv. BRS Tumucumaque tratadas com

óleo essencial de *Lippia sidoides*, *Lippia origanoides* e *Croton zehntneri* em diferentes concentrações em rolo de papel.

Tratamento	% de germinação*
Testemunha (sem óleo)	90,50 a
<i>Croton zehntneri</i> (4 mL Kg <sup>-1</sup> )	91,00 a
<i>Lippia sidoides</i> (4 mL Kg <sup>-1</sup> )	87,5 a
<i>Lippia origanoides</i> (4 mL Kg <sup>-1</sup> )	77,00 ab
<i>Croton zehntneri</i> (8 mL Kg <sup>-1</sup> )	57,00 b
<i>Lippia origanoides</i> (8 mL Kg <sup>-1</sup> )	35,00 c
<i>Lippia sidoides</i> (8 mL Kg <sup>-1</sup> )	23,00 c
<b>CV % = 11,30</b>	

\*As medias seguidas pela mesma letra não difere estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

A observação realizada por Hillen et al (2012), acerca de provável ação tóxica de óleos essenciais aplicados diretamente nas sementes, provocou a necessidade de estudar esse fenômeno no presente trabalho. Isto porque para uma substância ser empregada no tratamento de sementes, não basta que ela tenha ação efetiva contra os alvos biológicos, mas, também, não exerça qualquer ação deletéria sobre o desenvolvimento das plantas (Cunha et al. 2015).

Em relação a isso existem trabalhos que visam à utilização do óleo essencial no controle de fitopatógenos existentes na própria semente, verificando inclusive, seu possível efeito fitotóxico (Xavier et al. 2012; Freddo et al., 2016; Pereira et al., 2016). Visando avaliar a influência do tratamento de sementes de feijão caupi com o óleo essencial de citronela (*Cymbopogon winterianus*), Xavier et al. (2012) observaram que não houve diferença na porcentagem de germinação das sementes tratadas com o óleo essencial nas diferentes concentrações. Entretanto, quando comparadas à testemunha, apresentaram menor porcentagem de germinação, não sendo, portanto, adequado o tratamento de sementes com o

referido óleo.

As pesquisas com óleos essenciais visam, entre outros aspectos, desenvolver produtos que possam ser eficazes e seguros para o tratamento de sementes e que possam reduzir o impacto ambiental decorrentes do uso de fungicidas, isolados ou em combinação com outros métodos (Machado 2000). Todavia, como os estudos relacionados ao tratamento de sementes com óleos essenciais são relativamente recentes e não se dispõem de muitas informações acerca do efeito provocado por óleos essenciais, trabalhos como este trazem uma nova perspectiva, e devem estimular mais estudos nessa área. Com isso, espera-se em futuro próximo, sanar todas as dúvidas com relação a viabilidade da aplicação prática dos óleos essenciais nos diferentes sistemas agropecuários e farmacológicos.

#### **4. Conclusões**

Os constituintes químicos majoritários presentes nos óleos essenciais estudados são o timol, em *L. sidoides*, o carvacrol em *L. origanoides* e o estragol em *C. zehntneri*.

O fungo *S. rolfsii* é sensível aos óleos essenciais avaliados, *in vitro* e *in vivo*, especialmente aos de *L. sidoides* e *L. origanoides*.

O tratamento de sementes com o óleo essencial de *L. sidoides*, *L. origanoides* e *C. zehntneri* é efetivo no controle *in vivo* de *S. rolfsii* na concentração de 4,0 ml kg<sup>-1</sup> em sementes de feijão-caupi. Concentrações maiores interferem negativamente na germinação.

#### **5. Referências**

Aguiar, U. N.; Lima, S. G.; Rocha, M. S.; Freitas, R. M.; Oliveira, T. M.; Silva, R. M.; Moura, L. C. B.; Almeida, L. T. G., 2014. Preparação e caracterização do complexo de inclusão do óleo essencial de *Croton zehntneri* com  $\beta$ -ciclodextrina. *Quim. Nova*, 37 (1) 50-55. <http://www.scielo.br/pdf/qn/v37n1/10.pdf>

Athayde Sobrinho, C., Viana, F. M. P., Santos, A. A. 2005. Doenças Fúngicas e Bacterianas. In: Freire Filho, F. R.; Lima, J. A. A.; Ribeiro, V. Q. Feijão-caupi: avanços tecnológicos. 1 ed. Brasília: Embrapa Meio-Norte, 461-484

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck D., Idaomar, M. 2008. Biological effects of essential oils: a review. Food Chem Toxicol. 46 (2) 446-475.  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691507004541>

Bedendo, I. P. 2011. Podridões de raiz e colo. In: Amorim, L., Rezende, J. A. M., Bergamim Filho, A. Manual de fitopatologia. Piracicaba: Agronômica Ceres. 1 (23) 443-449.

Bozik, M., Císarová, M., Tancinová, D., Kouřimská, L., Hleba, L., Klouček, P. 2017. Selected essential oil vapours inhibit growth of *Aspergillus* spp. in oat with improved consumer acceptability. Ind Crop Prod. 98 146-152.  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092666901630807X>

BRASIL. 2009. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: MAPA/ACS, 395 p.

Cardoso, J. E. 1994. Podridão de colo. In: Sartorato, A.; Rava, C. A. (Eds.). Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle. EMBRAPA. Brasília. 165-174.

Carvalho, R. R. C., Laranjeira, D., Carvalho Filho, J. L. S., Souza, P. E., Blank, A. F., Alves, P. B., Jesus, H. C. R., Warwick, D. R. N. 2013. *In vitro* activity of essential oils of *Lippia sidoides* and *Lippia gracilis* and their major chemical components against *Thielaviopsis paradoxa*, causal agent of stem bleeding in coconut palms. Quim Nova. 36 (2) 241-244.  
<http://www.scielo.br/pdf/qn/v36n2/v36n2a07.pdf>.

Costa, J. G. M., Rodrigues, F. F. G., Angélico, E. C., Pereira, C. K. B., Souza, E. O., Caldas, G. F. R., Silva, M. R., Santos, N. K. A., Mota, M. L., Santos, P. F. 2008. Composição química



e avaliação da atividade antibacteriana e toxicidade do óleo essencial de *Croton zehntneri* (variedade estragol). Rev. bras. farmacogn. 18 (4) 583-586. <http://www.scielo.br/pdf/rbfar/v18n4/v18n4a15.pdf>.

Craveiro, A. A. 1981. Óleos essenciais de plantas do Nordeste. Fortaleza: Edições UFC, 209 p.

Cunha, A. O., Andrade, L. A., Bruno, R. L. A., Silva, J. A.L., Souza, V. C. 2005. Efeitos de substratos e das dimensões dos recipientes na qualidade das mudas de *Tabebuia impetiginosa* (Mart. Ex D.C.) Standl. Rev. Árvore. 29 (4) 507-516. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=48829402>.

Damasceno, E. I. T., Silva, J. K. R., Andrade, E. H. A., Sousa, P. J. C., Maia, J. G. S. 2011. Antioxidant capacity and larvicidal activity of essential oil and extracts from *Lippia grandis*. Rev. bras. farmacogn. 21 (1) 78-85. <http://www.scielo.br/pdf/rbfar/v21n1/aop1511.pdf>.

Daronco, M. V., Schneider, A., Viau, L. V. M., Colet, C. F. 2015. Avaliação da eficácia de óleos essenciais no tratamento de sementes de soja. Cien. Agric. 13 (1) 49-58. <http://www.seer.ufal.br/index.php/revistacienciaagricola/article/view/1870>.

Ferreira, D.F. 2011. Sisvar: a computer statistical analysis system. Ciênc. agrotec. 35, 1039-1042. <http://www.scielo.br/pdf/cagro/v35n6/a01v35n6.pdf>

Fontenelle, R. O. S., Morais, S. M., Brito, E. H. S., Brilhante, R. S. N., Cordeiro, R. A., Nascimento, N. R. F., Kerntopf, M. R., Sidrim, J. J. C., Rocha, M. F. G. 2008. Antifungal activity of essential oils of *Croton* species from the Brazilian *Caatinga* biome. J Appl. Microbiol. 104, 1383–1390. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18298533>.

Freddo, A. R., Mazaro, S. M., Borin, M. S. R., Busso, C., Possenti, J. C., Cechin, F. E., Zorzi, I. C., Dalacosta, N. L. 2016. Redução no tombamento de *Fusarium* sp. em plântulas de beterraba, pelo tratamento das sementes com óleo essencial de *Aloysia citriodora* palau. Sci.

Agrar. Parana, 15 (4) 453-459. <http://e-revista.unioeste.br/index.php/scientiaagraria/article/view/13451>

Girardi, N.S., García, D., Passone, M.A., Nesci, A., Etcheverry, M. 2017. Microencapsulation of *Lippia turbinata* essential oil and its impact on peanut seed quality preservation. Int Biodeterior Biodegradation. 116, 227-233. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0964830516306771>

Gomes, M. S., Cardoso, M. G., Soares, M. J., Batista, L. R., Machado, S. M. F., Andrade, M. A., Azeredo, C. M. O., Resende, J. M. V., Rodrigues, L. M. A. 2014. Use of essential oils of the genus *Citrus* as biocidal agents. Am J Plant Sci. 5, 299-305. <https://www.scirp.org/journal/PaperInformation.aspx?PaperID=42531>

Gomes, R. S. S., Nunes, M. C., Nascimento, L. C., Souza, J. O., Porcino, M. M. 2016. Eficiência de óleos essenciais na qualidade sanitária e fisiológica em sementes de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.). Rev. bras. Plantas Med. 18 (1) 279-287. <http://www.scielo.br/pdf/rbpm/v18n1s1/1516-0572-rbpm-18-1-s1-0279.pdf>

Gonçalves, A. H., Pereira, A. S., Santos, G. R. S., Guimarães, L. G. L. 2015. Atividade fungitóxica *in vitro* dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* Cham., *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf. e de seus constituintes majoritários no controle de *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii*. Rev. Bras. Plantas Med. 17 (4) 1007-1015. <http://www.scielo.br/pdf/rbpm/v17n4s3/1516-0572-rbpm-17-4-s3-1007.pdf>

Goulart, A. C. P. 2007. Suscetibilidade de cultivares de algodoeiro a *Rhizoctonia solani* e benefícios do tratamento de sementes com fungicidas. Summa Phytopathol. 33 (3) 222-228. <http://www.scielo.br/pdf/sp/v33n3/02.pdf>

- Guimarães, L. G. L., Cardoso, M. G., Souza, R. M., Zacaroni, M. B., Santos, G. R. 2014. Óleo essencial de *Lippia sidoides* nativas de Minas Gerais: composição, estruturas secretoras e atividade antibacteriana. Rev. Ciênc. Agron. 45 (2) 267-275. <http://ccarevista.ufc.br/seer/index.php/ccarevista/article/view/2515>
- Henning, A. A., França Neto, J. B., Krzyzanowski, F. C., Lorini, I. 2010. Importância do tratamento de sementes de soja com fungicidas na safra 2010/2011, ano de “La Niña”. Londrina: Embrapa Soja, 8p. (Circular Técnica, 82). <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/23533/1/CT-82.indd.pdf>
- Hillen, T., Schwan-Estrada, K. R. F., Mesquini, R. M., Cruz, M. E. S., Stangarlin, J. R., Nozaki, M. 2012. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais no controle de alguns fitopatógenos fúngicos *in vitro* e no tratamento de sementes. Rev. Bras. Plantas Med. 14 (3) 439-445. <http://www.scielo.br/pdf/rbpm/v14n3/03.pdf>
- Khanuja, S. P.S., Shasany, A. K., Pawar A., Lal, R.K., Darokar, M.P., Naqvi, A.A., Rajkumar, S., Sundaresan, V., Lal, N., Kumar, S. 2005. Essential oil constituents and RAPD markers to establish species relationship in *Cymbopogon* Spreng. (Poaceae). Biochem Syst Ecol. 33, 171-86. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0305197804001905>
- Lemos, T. L. G., Matos, F. J. A., Alencar, J. W., Craveiro, A. A., Clark, A. M., Mcchesney, J. D. 1990. Antimicrobial activity of essential oils of Brazilian plants. Phytother Res. 4 (2) 82–84. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/ptr.2650040210>
- Lobato, A. K. S., Santos, D. G. C., Oliveira, F. C., Gouvea, D. D. S., Torres, G. I. O. S., Lima-Junior, J. Á., Oliveira-Neto, C. F., Silva, M. H. L. 2007. Ação do óleo Essencial de *Piper aduncum* L. utilizado como fungicida natural no tratamento de sementes de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. Rev Bras Biocienc. 5 (2) 915-917. <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/750>

Lorenzi, H., Matos, F. J. A. 2002. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas. Ed: Nova Odessa, São Paulo. Instituto Plantarum. 512p.

Machado, J. C. 2000. Tratamento de sementes no controle de doenças. Lavras: LAPS/FAEPE, 138p.

Manaf, H. H., Zayed, M. S. 2015. Productivity of cowpea as affected by salt stress in presence of endomycorrhizae and *Pseudomonas fluorescens*. Ann of Agricult Sci, 60 (2) 219-226. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0570178315000500>

Menten, J.O.M. 1995. Patógenos em Sementes, Detecção, Danos e Controle Químico. São Paulo: Ciba Agro.

Mertz, L. M., Henning, F. A., Zimmer, P. D. 2009. Bioprotetores e fungicidas químicos no tratamento de sementes de soja. Cienc. Rural. 39 (1) 13-18. <http://www.scielo.br/pdf/cr/v39n1/a03v39n1.pdf>

Morais, L. A. S. 2009. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. Hortic. Bras. 27 (2) 4050-4063. [http://www.abhorticultura.com.br/eventosx/trabalhos/ev\\_3/P\\_4\\_Palestra\\_Resumo\\_Lilia\\_Ap.pdf](http://www.abhorticultura.com.br/eventosx/trabalhos/ev_3/P_4_Palestra_Resumo_Lilia_Ap.pdf)

Morão, R. P., Almeida, A. C., Martins, E. R., Prates, J. P. B., Oliveira, F. D. 2016. Constituintes químicos e princípios farmacológicos do óleo essencial de alecrim pimenta (*Lippia origanoides*). Unimontes Cient. 18 (1) 74 – 81. <http://www.ruc.unimontes.br/index.php/unicientifica/article/view/372>

Nagao, E. O., Innecco, R., Medeiros Filho, S., Mattos, S. H. 2002. Efeito do óleo essencial de Alecrim pimenta (*Lippia sidoides* Cham) na germinação de alface. Hortic Bras. 20 (2). [http://www.abhorticultura.com.br/biblioteca/arquivos/Download/Biblioteca/42\\_046.pdf](http://www.abhorticultura.com.br/biblioteca/arquivos/Download/Biblioteca/42_046.pdf)

- Özkan, A., Erdoğan, A. 2011. A comparative evaluation of antioxidant and anticancer activity of essential oil from *Origanum onites* (Lamiaceae) and its two major phenolic components. *Turk J Biol.* 35, 735-42. <http://dergipark.gov.tr/download/article-file/121149>
- Pereira, K. C., Reda, F. R., Piveta, G., Garcia, F. A. O. 2016b. Avaliação de óleos essenciais na qualidade sanitária e fisiológica em sementes e mudas de *Schinus molle*. *Pesq Florest Bras.* 36 (85) 71-78. <https://doi.org/10.4336/2016.pfb.36.85.905>
- Pereira, T. S., Lima, M. D. R., Paula, L. S., Lobato, A. K. S. 2016a. Tolerance to water deficit in cowpea populations resulting from breeding program: detection by gas exchange and chlorophyll fluorescence. *Indian J Plant Physiol.* 21 (2) 171-178, <https://doi.org/10.1007/s40502-016-0218-3>
- Queiroz, M. R. A., Almeida, A. C., Andrade, V. A., Lima, T. S., Martins, E. R., Figueiredo, L. S., Careli, R. T. 2014. Avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial de *Lippia origanoides* frente à *Staphylococcus* sp. isolados de alimentos de origem animal. *Rev. Bras. Plantas Med.* 16 (3) 737-743. <http://www.scielo.br/pdf/rbpm/v16n3s1/14.pdf>
- Rao, E. V. S. P., Rao, R. S. G., Puttanna, K. 2001. Studies on in situ soil moisture conservation and additions of phosphorus and potassium in rainfed palmarosa (*Cymbopogon martini* var. *motia*) in a semi-arid tropical region of India. *Eur J Agron.* 14 (3) 167-172, [https://doi.org/10.1016/S1161-0301\(00\)00064-2](https://doi.org/10.1016/S1161-0301(00)00064-2)
- Santos, E. S., Carvalho, R. A., Lacerda, J. T. 2008. Alternativas naturais e ecológicas no controle de doenças fúngicas do inhame (*Dioscorea* spp). *Tecnol. & Ciên. Agropec.* 2 (2) 1-6. [http://revistatca.pb.gov.br/edicoes/volume-02-2008/volume-2-numero-2-junho-2008/tca01\\_inhame.pdf](http://revistatca.pb.gov.br/edicoes/volume-02-2008/volume-2-numero-2-junho-2008/tca01_inhame.pdf)

Sellamuthu, P. S., Sivakumar, D., Soundy, P. 2013. Antifungal activity and chemical composition of thyme, peppermint and citronella oils in vapor phase against avocado and peach postharvest pathogens. *J. Food Saf.* 33, 86 - 93. <https://doi.org/10.1111/jfs.12026>

Sodaeizadeh, H., Rafieiohossaini, M., Van Damme, P. 2010. Herbicidal activity of a medicinal plant, *Peganum harmala* L., and decomposition dynamics of its phytotoxins in the soil. *Ind Crops Prod.* 31 (2) 385-394. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2009.12.006>

Teixeira, M. L. 2013. Óleos essenciais de *Lippia organoides* Kunth. e *Mentha spicata* L.: composição química, potencialidades biológicas e caracterização das estruturas secretoras. 123f. Dissertação (Agroquímica) Programa de Pós-Graduação em Agroquímica. Universidade Federal de Lavras. UFLA. Lavras, MG. [http://repositorio.ufla.br/bitstream/1/670/3/DISSERTACAO\\_%C3%93leos%20essenciais%20de%20Lippia%20organoides%20Kunth.%20e%20Mentha%20spicata%20L.PDF](http://repositorio.ufla.br/bitstream/1/670/3/DISSERTACAO_%C3%93leos%20essenciais%20de%20Lippia%20organoides%20Kunth.%20e%20Mentha%20spicata%20L.PDF)

Veras, H. N. H., Rodrigues, F. F. G., Botelho, M. A., Menezes, I. R. A., Coutinho, H. D. M., Costa, J. G. M. 2013. Enhancement of aminoglycosides and  $\beta$ -lactams antibiotic activity by essential oil of *Lippia sidoides* Cham. and the Thymol. *Arab J Chem.* 10, 2790-2795. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.10.030>

Wang, X., Liu, W., Xin, C., Zheng, Y., Cheng, Y., Sun, S., Li, R., Zhu, X., Dai, S. Y., Rentzepis, P. M., Yuan, J. S. 2016. Enhanced limonene production in cyanobacteria reveals photosynthesis limitations. *Proc Natl Acad Sci USA.* 113 (50) 14225-14230. <https://doi.org/10.1073/pnas.1613340113>

Xavier, M. V. A., Oliveira, C. R. F., Brito, S. S. S., Matos, C. H. C., Pinto, M. A. D. S. C. 2012. Viabilidade de sementes de feijão caupi após o tratamento com óleo essencial de citronela (*Cymbopogon winterianus* Jowitt). *Rev. Bras. Plantas Med.*, 14, 250-254. <http://www.scielo.br/pdf/rbpm/v14nspe/21.pdf>

## Capítulo IV

---

### **Efeito da biofumigação do solo com óleo essencial sobre incidência de *Sclerotium rolfsii* Saac em feijão-caupi**

## Efeito da biofumigação do solo com óleo essencial sobre incidência de *Sclerotium rolfsii*

### Saac em feijão-caupi

Ananda Rosa Beserra Santos<sup>a</sup>, Larisse Raquel Carvalho Dias<sup>b</sup>, Edymilaís da Silva Sousa<sup>c</sup>,  
Christian Dário Silva de Melo<sup>c</sup>, Sidney Gonçalo de Lima<sup>c</sup>, Paulo Henrique Soares da Silva<sup>d</sup>,  
Delson Laranjeira<sup>a</sup>, Candido Athayde Sobrinho<sup>d\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Agricultura, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s / n, 52171-900 Recife - PE, Brasil

<sup>b</sup> Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual do Maranhão, Cidade Universitária Paulo VI, S / N, 65055-310, São Luís, MA, Brasil

<sup>c</sup> Laboratório de Geoquímica Orgânica, Universidade Federal do Piauí, 64049-550, Bairro Ininga - PI, Brazil.

<sup>d</sup> Embrapa Meio-Norte, 64008-780 - Teresina - PI, Brazil

\*E-mail: candido.athayde@embrapa.br

## RESUMO

A murcha de esclerócio é uma grave doença que ocorre na cultura de feijão-caupi no Brasil e o seu controle com produtos químicos é uma opção pouco empregada. O presente trabalho teve como objetivo caracterizar quimicamente e avaliar o efeito dos óleos essenciais de *Lippia sidoides*, *Lippia origanoides* e *Croton zehntneri* no controle da murcha de esclerócio em feijão-caupi cultivar BRS Tumucumaque em ensaios *in vitro* e *in vivo*. Os experimentos tiveram



delineamento inteiramente ao acaso em arranjo fatorial, com seis concentrações dos três óleos e quatro tempos de biofumigação. Cada tratamento teve quatro repetições, cada uma com três plantas. Timol, carvacrol e estragol foram definidos como constituintes majoritários para *L. sidoides*, *L. origanoides* e *C. zehntneri*, respectivamente. Concentrações a partir de 3,18  $\mu\text{L placa}^{-1}$  inibiram completamente a germinação de esclerócios nos ensaios *in vitro*. Nos ensaios *in vivo*, o óleo de *L. sidoides* destacou-se dos demais reduzindo a incidência da doença em 51%, demonstrando que a biofumigação, à baixas concentrações, é uma alternativa potencial ser utilizada no controle da murcha de esclerócio.

**Palavras-chave:** Controle alternativo. Murcha de esclerócio. *Vigna unguiculata* (L.) Walp.

## 1. Introdução

O fungo *Sclerotium rolfsii* Sacc é uma espécie polífaga que pode causar perdas em importantes culturas como o amendoim, alho, cebola, pimenta e feijão (Fery; Dukes, 2011; Adandonon et al., 2006; Earnshaw et al., 2000). Em feijão-caupi, induz a murcha de esclerócio e provoca, inicialmente, lesões marrons e aquosas sobre a região do colo da planta que avançam, produzindo escurecimento e podridão, resultando em destruição do córtex e da raiz principal. As plantas severamente afetadas têm o colo colapsado, provocando murcha da parte aérea, seca, queda de folhas e morte (Kimati et al., 2011).

A carência de fungicidas registrados para a murcha de esclerócio em feijão-caupi, aliado aos danos ambientais causados pelo uso indiscriminado dos agroquímicos, tem estimulado a busca por produtos alternativos para o manejo da doença. O uso de plantas medicinais, tem sido constante desde a idade média (Bakkali et al., 2008; Boukhatem et al., 2014). Dentre essas substâncias de origem natural, os óleos essenciais possuem importância econômica e científica, tendo aplicabilidade nos mais variados setores (Bernardos et al., 2015). Diversos estudos têm demonstrado que eles possuem interessantes propriedades biológicas,

como ação larvicida (Rajkumar; Jebanesan, 2010), antioxidante (Wannes et al., 2010), analgésico e anti-inflamatório (Mendes et al., 2010), fungicida (Carmo et al., 2008) e inseticida (Knaak; Fiuza, 2010).

É possível encontrar, na literatura, trabalhos reportando o potencial fungitóxico de óleos essenciais sobre fungos fitopatogênicos (Gonçalves et al., 2015; Dias et al., 2019). Entretanto, a grande maioria dos trabalhos com óleos essenciais são realizados na condição *in vitro* e, apesar dos expressivos resultados obtidos, a necessidade de se validar os resultados em bioensaios *in vivo* é imprescindível. A possibilidade de uso dos óleos essenciais no controle de fitomoléstias, tanto no manejo isolado quanto no manejo integrado, constitui-se em uma alternativa econômica e ecológica, especialmente considerando-se o custo dos defensivos químicos e seus efeitos causados ao meio ambiente (Taiz; Zeiger, 1998; Lima et al., 2008).

A biofumigação, tem mostrado resultados satisfatórios no controle de bactérias (Paret et al., 2010) e nematoides (Castro, 2010). Não se encontraram na literatura, entretanto, relatos de biofumigação para fungos fitopatogênicos. Vários componentes de óleos essenciais, como timol, carvacrol e linalol, dentre outros, têm demonstrado eficácia como agentes antimicrobianos (Andrade et al., 2014; Carvalho et al., 2013; Medeiros et al., 2011) sendo promissores no controle de fungos fitopatogênicos. Diante dessa realidade o presente trabalho teve como objetivos determinar a constituição química e avaliar o efeito da biofumigação com óleos essenciais de *Lippia sidoides*, *Lippia origanoides* e *Croton zehntneri* sobre a germinação e viabilidade dos esclerócios.

## **2. Material e métodos**

### **2.1 Obtenção do fungo e da cultivar**

O isolado fúngico de *Sclerotium rolfsii* utilizado é pertencente à Coleção de Fungos de Solo da Universidade Federal Rural de Pernambuco sob o número CFS 614. As sementes de feijão-caupi, da cultivar BRS Tumucumaque, foram cedidas pelo Programa de Melhoramento

Genético de Feijão-caupi da Embrapa.

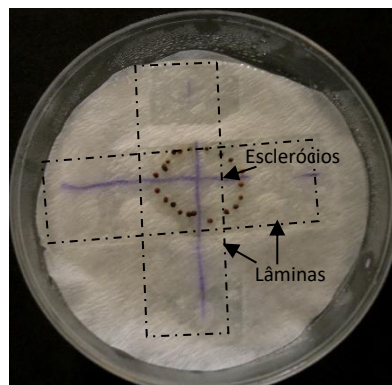
## **2.2 Obtenção e análise da composição química dos óleos essenciais**

Utilizaram-se os óleos essenciais de *Lippia sidoides*, *Lippia organoides*. e *Croton zehntneri*. As folhas de *L. sidoides* foram coletadas em Teresina e a exsicata depositada no Herbário Graziela Barroso com o número TEPB 18743. As folhas de *L. organoides* foram coletadas em Jatobá do Piauí e sua exsicata registrada sob o número CESJ 70120 no Herbário Leopoldo Krieger e as de *C. zehntneri*, originadas em Valença do Piauí, registrada no Herbário Graziela Barroso sob o número TEPB 30944. A pesquisa com estas espécies está cadastrada no SISGEN processo nº AFE8A1E.

A extração dos óleos essenciais foi realizada utilizando-se o método de hidrodestilação, em aparelho de Clevenger, acoplado a manta aquecedora, como fonte de calor para o sistema (Gomes et al., 2014). Em cada extração foram utilizados 200g de folhas desidratadas e previamente trituradas. A constituição química dos óleos foi obtida por meio de cromatógrafo (GCMS-QP2010 SE, AOC-5000 auto injetor da SHIMADZU), seguindo as seguintes condições de análise: injetor 250°C, e temperatura inicial do forno de 60 °C, apresentando uma rampa de aquecimento 3 °C por mim até 240 °C permanecendo por 10 minutos, razão Split de 1:100, temperatura da interface 350 °C e fonte de 250 °C, faixa de massa de 40 a 600 Daltons, ionização por impactos de elétrons, 70 eV. Para separação cromatográfica dos componentes foi empregada uma coluna Rxi-5HT, 30 m × 0,25 mm, espessura do filme interno de 0,10 µm com fase estacionária de difenil dimetilpolissiloxano, tendo o Hélio como gás de arraste. A identificação dos constituintes foi feita por comparação das ordens de eluição, com dados da literatura.

## **2.3 Biofumigação *in vitro* de óleos essenciais sobre a germinação e viabilidade de esclerócios**

Para avaliar o efeito fumigante dos diferentes óleos essenciais sobre a viabilidade de esclerócios do fungo *S. rolfsii*, utilizou-se cinco concentrações (3,18; 6,46; 12,8; 25,62 e, 51,25  $\mu\text{L placa}^{-1}$ ) e mais uma testemunha, sem óleo. Em cada placa de Petri, com volume fumigável de 102,5  $\text{cm}^3$ , foram colocadas, três folhas de papel germitest embebidos em água estéril. Sobre a primeira folha colocou-se a concentração testada no centro do papel e duas lâminas de microscopia sobrepostas ortogonalmente, visando evitar o contato direto entre o óleo e os esclerócios do fungo (Figura 1). Sobre as lâminas, a segunda folha, onde foram marcados os quatro quadrantes e distribuídos cinco esclerócios em cada um. Após estes, a terceira folha cobrindo os esclerócios. As placas foram então vedadas com filme plástico e acondicionadas em estufas do tipo BOD à temperatura de  $25\pm 2^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 12h. Os tempos de biofumigação foram 0; 24; 48 e 72h. As placas eram abertas de acordo com o tempo de biofumigação proposto e os esclerócios verificados quanto à sua germinação.



**Figura 1.**

Distribuição radial dos esclerócios de *Sclerotium rolfsii* e da sobreposição ortogonal das lâminas de microscopia em relação ao papel germitest. Teresina, PI, 2018

O experimento foi disposto em delineamento inteiramente ao acaso em arranjo fatorial, com seis concentrações de três óleos e quatro tempos de biofumigação. Cada tratamento teve quatro repetições, consistindo em um quadrante em placa de Petri (90 mm) com cinco

esclerócios cada. As avaliações foram realizadas diariamente, durante um período de 4 dias, sendo considerada a germinação dos esclerócios.

#### **2.4 Biofumigação do solo com óleos essenciais**

Para a realização da biofumigação, utilizaram-se vasos plásticos de 0,780 litros, contendo areia vegetal e casca de arroz carbonizada (3:1) previamente esterilizado em autoclave e infestado com *S. rolfsii*. A infestação do solo deu-se com a deposição de quatro grãos de arroz com casca autoclavado colonizado pelo fungo. Para o preparo do inóculo, utilizou-se 200g de arroz com casca acrescido de 200 mL de água destilada e estéril em erlenmeyer autoclavado a 1 atm por 20 minutos. Após resfriamento, depositou-se sete discos de 5 mm de diâmetro contendo fragmentos da colônia de *S. Rolfsii* com quatro dias de idade, cultivado em BDA. Passados cinco dias da infestação, efetuou-se a deposição do inóculo nos vasos, que foram incubados por 20 dias, de modo a permitir a colonização do solo do vaso com o fungo.

Em solo infestado, alíquotas dos óleos essenciais foram aplicadas diretamente no centro dos vasos em sulcos de  $\pm 4$  cm de profundidade, definindo um volume fumigável de 780 cm<sup>3</sup>. Utilizaram-se as concentrações de 0,0; 24,4; 48,8; 97,5; 195 e; 390  $\mu\text{L}$  vaso<sup>-1</sup>. Imediatamente após a aplicação do óleo no solo, os vasos foram vedados com filme plástico para a biofumigação, sendo o conjunto disposto sobre bancada em casa-de-vegetação, e mantido nessa condição por 0; 24; 48 e 72 horas, correspondendo aos tempos de biofumigação estabelecidos nos tratamentos. Respeitando-se esses tempos e após a abertura dos vasos, realizou-se a semeadura do feijão-caupi CV. BRS tumucumaque, com três sementes dispostas equidistantemente em torno do sulco.

O experimento foi organizado em delineamento inteiramente ao acaso em arranjo fatorial, com seis concentrações de três óleos e quatro tempos de biofumigação. Cada tratamento teve quatro repetições, cada uma com três plantas. As avaliações foram realizadas diariamente, durante um período de 20 dias, sendo considerada a incidência da doença que

consistiu na contagem das plantas com sintomas de necrose, constrição no colo e morte das plântulas devido ao ataque do fungo, segundo metodologia adaptada de Abawi e Pastor Corrales (1990), conforme a Figura 2.



**Figura 2.**

Padrão sintomatológico de referência usado na avaliação da incidência da murcha de esclerócio em feijão-caupi. Teresina, PI, 2018.

## **2.5 Análise estatística**

Os resultados de incidência obtidos foram transformados em percentagem e submetidos a análise de variância, sendo o efeito das concentrações dos óleos e dos tempos de biofumigação avaliados por análise de regressão linear e as médias dos efeitos dos óleos comparadas entre si pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade. Para tanto, empregou-se o programa estatístico Sistema de Análise de Variância para Dados Balanceados – SISVAR, segundo Ferreira (2011).

## **3. Resultados e discussão**

### **3.1 Análise da composição química dos óleos**

Foi possível identificar 38 constituintes a partir da cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM), discriminando 95,9% em *L. sidoides* e 100% em *L. organoides* e *C. zehntneri*. Os constituintes majoritários foram timol (*L. sidoides*); carvacrol (*L. organoides*) e estragol (*C. zehntneri*) (Tabela 1) corroborando com Costa et al. (2008);

Carvalho et al. (2013) e Morão et al. (2016).

**Tabela 1.**

Índice de retenção (RI) e composição química dos óleos essenciais das folhas de *Lippia sidoides* (Ls), *Lippia origanoides* (Lo), e *Croton zehntneri* (Cz).

IR <sup>a</sup>	IR <sup>b</sup>	Composto	Ls	Lo	Cz
850	866	Z-3-HEXANEOL	0,5	-	-
924	921	$\alpha$ -THUJENE	1,1	1,1	-
932	928	$\alpha$ -PINENE	0,5	0,3	-
969	967	SABINENE	-	-	0,2
974	971	OCTEN-3-OL	0,7	-	-
988	984	$\beta$ -MYRCENE	2,2	2,0	-
1002	1001	$\alpha$ -PHELLANDRENE		0,1	-
1014	1011	$\alpha$ -TERPINENE	1,6	1,7	-
1020	1019	PARA-CYMENE	13,1	13,3	-
1024	1023	LIMONENE	0,8	0,4	-
1026	1025	1,8-CINEOLE	2,3	0,2	2,9
1032	1030	Z-OCIMENE	0,2	-	-
1044	1040	E- $\beta$ -OCIMENE	-	-	0,6
1054	1052	$\gamma$ -TERPINENE	4,3	7,8	-
1065	1060	Z SABINENE HIDRATE	0,4	-	-
1095	1093	LINALOOL	0,6	-	-
1174	1172	4-TERPINEOL	1,6	0,8	-
1186	1185	$\alpha$ -TERPINEOL	0,8	-	0,8
1195	1195	ESTRAGOLE		-	90,1
1232	1229	THYMOL METHYL ETHER	2,8	5,5	-

1241	1239	CARVACROL, METHYL ETER	-	0,4	-
1289	1290	THYMOL	33,2	3,0	-
1298	1297	CARVACROL	0,6	54,4	-
1349	1348	THYMOL ACETATE	0,3	0,5	-
1366	1366	PIPERITENONE OXIDE	-	-	-
1374	1370	$\alpha$ -COPAENE	-	0,6	-
1417	1414	TRANS-CARYOPHYLLENE	17,4	4,0	2,1
1432	1430	$\alpha$ -BERGAMOTENE		0,3	-
1439	1433	AROMADENDRENE	1,2	-	-
1452	1448	$\alpha$ -HUMULENE	0,9	0,1	-
1484	1476	GERMACRENE-D	1,1	-	-
1489	1481	$\beta$ -SABINENO	-	0,8	-
1494	1491	BICICLOGERMACRENE	2,8	-	-
1496	1488	VALENCENE	-	1,6	-
1500	1491	BICYCLOGERMACRENE	-	-	3,3
1522	1518	$\delta$ -CADINENE	0,4	0,6	-
1577	1573	SPATHULENOL	0,8	0,3	-
1582	1578	CARYOPHYLLENE OXIDE	3,7	0,4	-

IR<sup>a</sup>: índice de retenção relativo, calculado de acordo com a equação de Van Den Dool e Kratz (1963). Os compostos listados nesta tabela estão em ordem crescente de eluição em coluna Rxi-5HT, 30m  $\times$  0,25mm. IR<sup>b</sup>: índices de retenção experimentais.

É possível associar a constituição química dos óleos com seu modo de ação, já que a atividade exercida pelo óleo pode ter associação com o sinergismo de sua composição química, onde compostos como álcoois, fenóis, terpenóides e cetonas são apontados como os principais responsáveis pelas propriedades tóxicas (Sellamuthu et al., 2013). Os terpenóides (Tabela 2)



são capazes de tornar a membrana celular do fungo permeável, causando o vazamento de seu conteúdo (Knaak; Fiúza, 2010) sendo considerados os metabólitos secundários mais produzidos pelas plantas com aplicações nos diversos setores, como nas indústrias farmacêutica e de solventes (Wang et al., 2016).

**Tabela 2.**

Percentual de constituintes químicos agrupados dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* (Ls), *Lippia origanoides* (Lo) e *Croton zehntneri* (Cz).

Componentes agrupados	%		
	Ls	Lo	Cz
Monoterpenos	57,25	26,52	0,84
Monoterpenóides	10,39	64,75	93,75
Sesquiterpenos	23,94	8	5,41
Sesquiterpenóides	4,55	0,73	v
Outros	0,48	v	v
Não identificado	3,39	v	v

v: vestigial (<0,05%)

Dois componentes químicos, o timol e o carvacrol, apresentaram-se em maior quantidade no gênero *Lippia*. O óleo de *L. sidoides* apresentou 33,2% de timol e 0,6% de carvacrol, sendo descrito como potente antisséptico do grupo fenol, com atividade bactericida e fungicida (Lemos et al., 1990).

O óleo de *L. origanoides* apresentou 3,0% de timol e 54,4% de carvacrol, descrito com potencial atividades antimicrobianas (Lorenzi; Matos, 2002; Queiroz et al., 2014), corroborando com Costa et al. (2008), Fontenelle et al. (2008) e Aguiar et al. (2014) que identificaram, respectivamente, 76,8, 72,9 e 99,15% do constituinte. Os dois primeiros autores

provaram ainda, que o óleo essencial de *C. zehntneri* tem ação tóxica contra *Shigella flexneri* e *Microsporium canis*, respectivamente, encorajando dessa forma as pesquisas relacionadas ao controle de fungos fitoparasitas.

A constituição química encontrada neste trabalho assemelha-se a encontrada por Craveiro (1981) e Teixeira (2013). Para eles, os principais constituintes voláteis frequentemente encontrados nos óleos essenciais de diferentes espécies de *Lippia* são o timol, carvacrol, 1,8-cineol, limoneno, *p*-cimeno, linalol,  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -cariofileno.

### **3.2 Efeito da biofumigação de óleos essenciais sobre esclerócios em placa de Petri**

Todos os óleos essenciais analisados apresentaram resultados expressivos, inibindo em 100% a germinação dos esclerócios e o desenvolvimento micelial do patógeno a partir da menor concentração avaliada ( $3,18 \mu\text{L placa}^{-1}$ ), independentemente dos tempos de fumigação testados. Esse resultado mostra-se muito interessante porque demonstra a capacidade dos óleos de inibir a germinação e o desenvolvimento o fungo *S. rofsii* a partir de suas estruturas de resistência. Estas estruturas, os esclerócios, garantem a sobrevivência do fungo por muitos anos no solo na ausência de hospedeiros e sob condições ambientais desfavoráveis (Michereff et al., 2005).

Ensaio *in vitro* são importantes, tanto para dar suporte à condução dos trabalhos *in vivo*, quanto para auxiliar na definição das concentrações a serem usadas, fornecendo informações sobre a eficiência destas quanto ao potencial controle do patógeno. Eles permitem também verificar a possível interferência na germinação das estruturas de resistência do patógeno em condições controladas. Esses testes servem de ponto de partida para trabalhos em condições de campo. Carvalho et al. (2013); Sarrazin et al. (2015) e Fontenelle et al. (2008) também relataram ação antimicrobiana dos óleos essenciais de *L. sidoide*, *L. origanoides* e *C. zehntneri* no controle de fungos e bactérias, encorajando pesquisas *in vivo*. Guerra et al. (2015) avaliaram a formação de esclerócios de *Sclerotium rofsii* submetidos aos óleos essenciais de manjerição, junípero, palmarosa, eucalipto, cedro atlas, gengibre e copaíba a partir da adição

dos óleos em meio B.D.A fundente, obtendo êxito no controle de *S. rolfsii* com o óleo de palmarosa. Mahato et al. (2014) visualizaram a inibição de 88,49% no crescimento micelial de *S. rolfsii* usando óleo vegetal de Karanja (*Millettia pinnata*). Não foram encontrados na literatura consultada, relatos da ação dos óleos de *L. sidoides*, *L. origanoides* e *C. zehntneri* na inibição da germinação de esclerócios de *S. rolfsii*.

### 3.3 Efeito da biofumigação do solo com óleos essenciais sobre *S. rolfsii*

Os níveis de severidade observado nos ensaios foram suficientes para discriminar o efeito dos óleos, das concentrações e tempo de biofumigação do solo sobre a incidência da doença (Tabela 4). A análise de variância detectou diferenças significativas ( $P < 0,01$ ) entre óleos, concentrações, tempo de biofumigação, demonstrando ainda efeito significativo ( $P < 0,05$ ) para a interação óleos x tempo (Tabela 3).

#### Tabela 3.

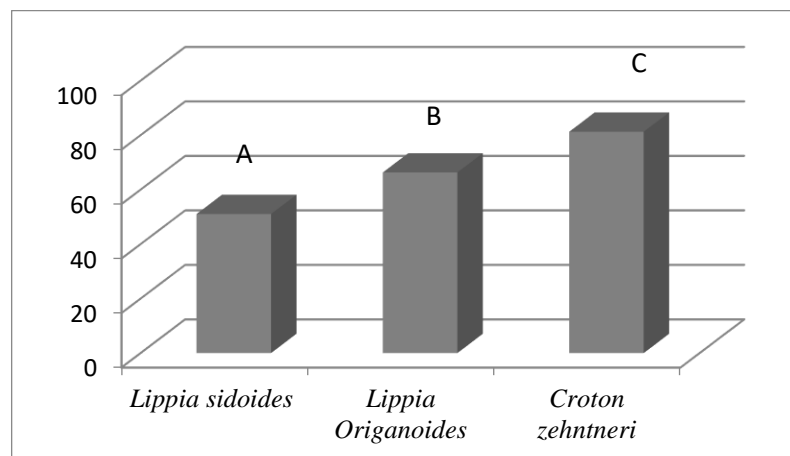
Resumo da análise de variância para incidência da murcha de esclerócio em plantas de feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] em diferentes concentrações e tempo de biofumigação do solo. Teresina, PI, 2018.

Fator de variação	GL	QM	Pr>F
<b>Óleos</b>	2	21903.067919	0.0000**
<b>Concentrações</b>	5	14090.673512	0.0000**
<b>Tempo</b>	3	6184.292257	0.0000**
<b>Óleos x Concentrações</b>	10	1221.373492	0.0736 <sup>ns</sup>
<b>Óleos x Tempo</b>	6	1603.374000	0.0370*
<b>Concentrações x Tempo</b>	15	1149.363209	0.0661 <sup>ns</sup>
<b>Óleos x Concentrações x Tempo</b>	30	620.596859	0.6445 <sup>ns</sup>

<b>Erro</b>	216	702.209138
<b>Total</b>	287	
<b>Média</b>	66,2	
<b>CV (%)</b>	25,04	

\*\* Significativo a 1%; \* significativo a 5%; ns não significativo.

Considerando o efeito dos três óleos na biofumigação do solo sobre a incidência de *S. rolfsii*, observou-se diferença significativa ( $P < 0,01$ ) do óleo de *L. sidoides* sobre os de *L. origanoides* e deste para *C. zehntneri*, os quais apresentaram incidências médias da murcha de esclerócio de 51, 55 e 81%, respectivamente. (Figura 3). Este último apresentou no geral menor efeito sobre a doença, notadamente quando comparado ao de *L. sidoides*.



**Figura 3.**

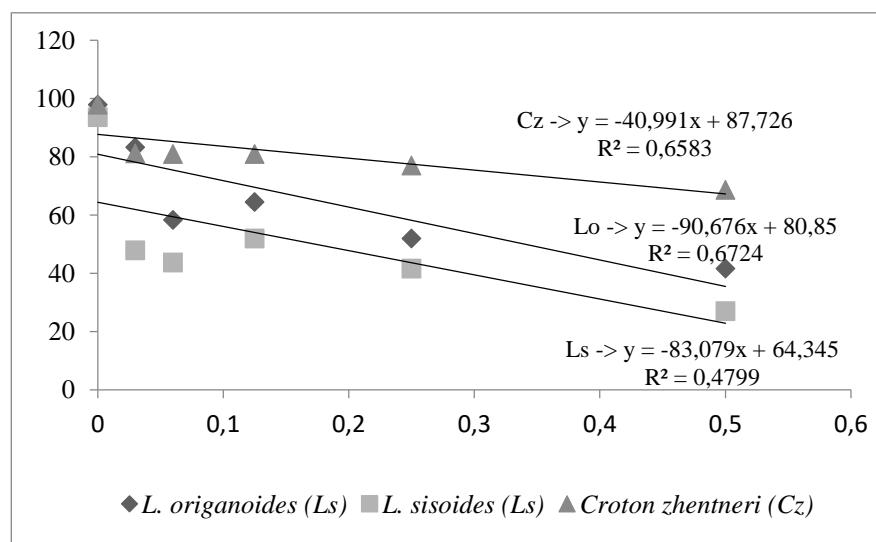
Incidência (%) de *Sclerotium rolfsii* Sacc. em planta de feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] após biofumigação do solo com óleo essencial. Incidência em porcentagem (eixo y), óleos (eixo x). Teresina, PI, 2018.

Ainda que não tenham sido encontrados na literatura resultados *in vivo*, existem trabalhos que apontam o óleo de *L. sidoides* e seu principal constituinte timol como promissor

em ação fungicida *in vitro* (Oliveira et al., 2018; Ferreira et al., 2018). O óleo de *L. origanoides* juntamente com o carvacrol, principal constituinte do óleo, demonstraram anteriormente atividades antimicrobianas (Queiroz et al., 2014).

Quando avaliado sobre culturas de *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus  $\beta$ -haemolyticus*, o óleo essencial de *C. zehntneri* e seu constituinte majoritário, o estragol, demonstraram potencial biológico e toxicidade ativa, incentivando pesquisas na busca de alternativas terapêuticas que possam servir de subsídio para novas fontes racionais a partir de produtos naturais (Costa et al., 2008). Entretanto, ainda existem poucos relatos quanto às pesquisas relacionadas a óleos essenciais e fungos fitopatogênicos.

Em relação ao efeito das concentrações sobre a incidência da doença, observa-se que o fenômeno se ajusta a um modelo linear decrescente à medida do aumento das concentrações do óleo estudado (Figura 4) comprovando os resultados obtidos na condição *in vitro*, uma vez que todos os óleos apresentaram efeito significativo ( $P < 0,01$ ) no controle da doença.

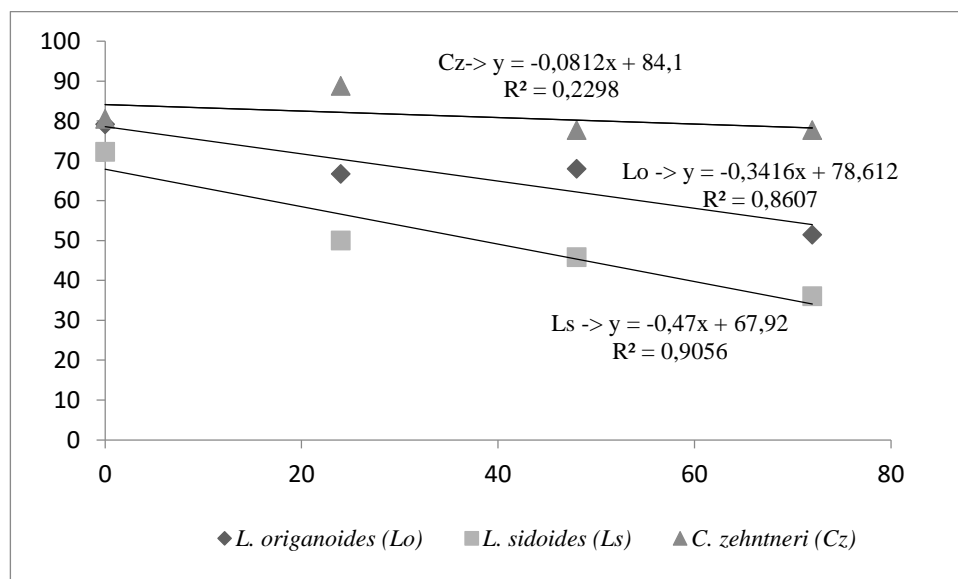


**Figura 4.**

Efeito *in vivo* da biofumigação do solo com óleos essenciais sobre a incidência de *Sclerotium rolfsii* Sacc. em feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp]. Incidência em porcentagem (eixo

y), concentrações em  $\mu\text{L vaso}^{-1}$  (eixo x). Teresina, PI, 2018.

Por outro lado, analisando-se o efeito do tempo de biofumigação a que o solo com estruturas fúngicas foi submetido é possível observar significativa redução na incidência da murcha de esclerócio, tendo sido observado efeito significativo ( $P < 0,01$ ) cujo comportamento obedece, à semelhança do obtido para efeito da concentração, um modelo linear decrescente (Figura 5). Avaliando a toxicidade do óleo de *Piper aduncum* L. em adultos de Chrysomelidae, Fazolin et al. (2005) verificaram que maiores intervalos de tempo de exposição do inseto ao óleo de *P. aduncum* demonstraram acréscimos nos valores da mortalidade devido, provavelmente, ao efeito inseticida do dilapiol, constituinte majoritário do óleo, igualmente às propriedades antimicrobianas atribuídas à timol e carvacrol.



**Figura 5.**

Efeito do tempo (h) de biofumigação do solo com óleos essenciais sobre a incidência de *Sclerotium rolfsii* Sacc. em feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.)Walp]. Incidência em percentagem (eixo y), tempo em horas (eixo x). Teresina, PI, 2018.

Guerra et al. (2015) comprovaram a eficácia do óleo essencial de *Cymbopogon martinii* no controle *in vivo* de *S. rolfsii* em dose única a 400 ppm, reduzindo a taxa da doença

em 55%. Estes resultados demonstram o potencial dos óleos essenciais a baixa concentração, servindo como opção no tratamento e prevenção da murcha de esclerócio.

Neste trabalho, comprovou-se o potencial dos óleos essenciais de *L. sidoides*, *L. origanoides* e *C. zehntneri* no controle de *S. rolfsii* a partir da biofumigação. Considerando-se a complexidade das formas de controle para *S. rolfsii* em campo e a carência de produto químico formulado para o patossistema, as informações contidas neste trabalho oferecem alternativas potenciais sustentáveis de controle da doença, sendo, portanto, uma opção para minimizar as perdas na produção de feijão-caupi, e os danos ao meio ambiente.

#### 4. Conclusões

Os principais constituintes dos óleos essenciais de *L. sidoides*, *L. origanoides* e *C. zehntneri* são o timol, o carvacrol e o estragol, respectivamente.

A viabilidade dos esclerócios de *S. rolfsii* é totalmente anulada quando estas estruturas são submetidas à biofumigação com óleos de *L. sidoides*, *L. origanoides* e *C. zehntneri* nas concentrações iguais e superiores a 3,18  $\mu\text{l placa}^{-1}$ .

A murcha de esclerócio, causada por *S. rolfsii* é potencialmente controlada pela biofumigação do solo com óleos essenciais de *L. sidoides*, *L. origanoides* e *C. zehntneri*.

#### 5. Referências

Abawi, G.S.; Pastor-Corrales, M.A. 1990. Root rots of beans in Latin America and Africa: diagnoses, research methodologies and management strategies. Colômbia. CIAT.

Adandonon, A., Aveling, T. A. S., Labuschagne, N., & Tamo, M. 2006. Biocontrol agents in combination with *Moringa oleifera* extract for integrated control of *Sclerotium*-caused cowpea damping-off and stem rot. Eur J Plant Pathol. 115, 409-418. <https://doi.org/10.1007/s10658->

006-9031-6

Aguiar, U. N.; Lima, S. G.; Rocha, M. S.; Freitas, R. M.; Oliveira, T. M.; Silva, R. M.; Moura, L. C. B.; Almeida, L. T. G., 2014. Preparação e caracterização do complexo de inclusão do óleo essencial de *Croton zehntneri* com  $\beta$ -ciclodextrina. *Quim. Nova*, 37 (1) 50-55. <http://www.scielo.br/pdf/qn/v37n1/10.pdf>

Andrade, B. F. M. T.; Barbosa, L. N.; Probst, I. S. 2014. Fernandes Júnior, A. Antimicrobial activity of essential oils. *J Essent Oil Res.* 26 (1) 34–40. <http://dx.doi.org/10.1080/10412905.2013.860409>

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck D., Idaomar, M. 2008. Biological effects of essential oils: a review. *Food Chem Toxicol.* 46 (2) 446-475. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691507004541>

Bernardos, A., Marina, T., Zacek, P., Pérez-Esteve, E., Martínez-Mañez, R., Lhotka, M., Kourimska, L., Pulkrabek, J., Kloucek, P., 2015. Antifungal effect of essential oils components against *Aspergillus niger* when loaded into silica mesoporous supports. *J. Sci. Food and Agric.* 95, 2824-2831. <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.7022>.

Boukhatem, M.N., Ferhat, M.A., Kameli, A., Saidi, F., Kebir, H.T., 2014. Lemon grass (*Cymbopogon citratus*) essential oil as a potential anti-inflammatory and antifungal drugs. *Libyan J. Med.* 9. <http://dx.doi.org/10.3402/ljm.v9.25431>.

Carmo, E. S.; Lima, E. O.; Souza, E. L. 2008. The potential of *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) essential oil in inhibiting the growth of some food-related *Aspergillus* species. *Braz. J. Microbiol.* 39, 362–367. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822008000200030>

Carvalho, R. R. C., Laranjeira, D., Carvalho Filho, J. L. S., Souza, P. E., Blank, A. F., Alves, P. B., Jesus, H. C. R., Warwick, D. R. N. 2013. *In vitro* activity of essential oils of *Lippia sidoides* and *Lippia gracilis* and their major chemical components against *Thielaviopsis*



*paradoxa*, causal agent of stem bleeding in coconut palms. Quim Nova. 36 (2) 241-244. <http://www.scielo.br/pdf/qn/v36n2/v36n2a07.pdf>.

Castro, D. B. 2010. Uso do óleo essencial de mostarda no controle de *Meloidogyne enterolobii* (= *M. mayaguensis*) em pomar de goiabeira. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais. p. 53.

Costa J. G. M.; Rodrigues F. F. G.; Angélico, E. C, Pereira, C. K. B.; Souza, E. O.; Caldas, G. F. R.; Silva, M. R.; Santos, N. K. A.; Mota, M. L.; Santos, P. F. 2008. Composição química e avaliação da atividade antibacteriana e toxicidade do óleo essencial de *Croton zehntneri* (variedade estragol). Rev. Bras. Farmacogn. 18 (4): 583-586. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2008000400015>

Craveiro, A. A. 1981. Óleos essenciais de plantas do Nordeste. Fortaleza: Edições UFC, 209 p.

Earnshaw, D. M., McDonald, M. R., & Boland, G. J. 2000. Interactions among isolates and mycelial compatibility groups of *Sclerotium cepivorum* and cultivars of onion (*Allium cepa*). Can J Plant Pathol. 22, 387-391. <https://doi.org/10.1080/07060660009500457>

Fazolin, M.; Estrela, J. L.V.; Catani, V.; Lima, M. S. Alécio, M. R. 2005. Toxicidade do óleo de *Piper aduncum* L. a adultos de *Cerotoma tingomarianus* Bechyné (Coleoptera: Chrysomelidae). Neotrop Entomol. 34 (3) 485-489. <http://dx.doi.org/10.1590/S1519-566X2005000300018>.

Ferreira, D.F. 2011. Sisvar: a computer statistical analysis system. Ciênc. agrotec. 35, 1039-1042. <http://www.scielo.br/pdf/cagro/v35n6/a01v35n6.pdf>

Ferreira, T. P. S.; Mourão, D. S. C.; Santos, G. R.; Guimarães, L. G. L.; Pires, E. C. F.; Santos, W. F.; Aguiar, R. W. S. 2018. Fungistatic activity of essential oil of *Lippia sidoides* Cham. against *Curvularia lunata*. Afr J Agric Res 13 (14) 704-713. DOI: 10.5897/AJAR2018.12977.

- Fery, R. L.; Dukes, P. D. 2011. Southern Blight (*Sclerotium rolfsii* Sacc.) of cowpea: Genetic characterization of two sources of resistance. *Inter J Agron*, 6p.
- Fontenelle, R. O. S.; Morais, S. M.; Brito, E. H. S.; Brilhante, R. S. N.; Cordeiro, R. A.; Nascimento, N. R. F.; Kerntopf, M. R.; Sidrim, J. J. C.; Rocha, M. F. G. 2008. Antifungal activity of essential oils of *Croton* species from the Brazilian *Caatinga* biome. *J Appl Microbiol*. 104: 1383–1390. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03707.x>
- Gomes, M. S., Cardoso, M. G., Soares, M. J., Batista, L. R., Machado, S. M. F., Andrade, M. A., Azeredo, C. M. O., Resende, J. M. V., Rodrigues, L. M. A. 2014. Use of essential oils of the genus *Citrus* as biocidal agents. *Am J Plant Sci*. 5, 299-305. <http://dx.doi.org/10.4236/ajps.2014.53041>
- Gonçalves, A. H., Pereira, A. S., Santos, G. R. S., Guimarães, L. G. L. 2015. Atividade fungitóxica *in vitro* dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* Cham., *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf. e de seus constituintes majoritários no controle de *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii*. *Rev. Bras. Plantas Med.* 17 (4) 1007-1015. <http://www.scielo.br/pdf/rbpm/v17n4s3/1516-0572-rbpm-17-4-s3-1007.pdf>
- Guerra, Y. L.; Oliveira, T. A. S.; Laranjeira, D.; Lima, L. M.; Melo Filho, P. A.; Santos, R. C. 2015. Control of *Sclerotium rolfsii* in peanut by using *Cymbopogon martinii* essential oil. *Afr J Microbiol Res*. 9 (27) 1684-1691. <https://doi: 10.5897/AJMR2015.7574>
- Kimati, H.; Amorim, L.; Bergamin Filho, A.; Camargo, L. E. A.; Resende, J. A. M. 2011. *Manual de fitopatologia: Doenças de plantas cultivadas*. 4. ed. Piracicaba: Ceres. 2. 663 p.
- Knaak, N.; Fiuza, L. M. 2010. Potencial dos óleos essenciais de plantas no controle de insetos e microrganismos. *Neotropical Biol Conservat*. 5 (2) 120-132. <https://doi: 10.4013/nbc.2010.52.08>

- Lemos, T. L. G., Matos, F. J. A., Alencar, J. W., Craveiro, A. A., Clark, A. M., Mcchesney, J. D. 1990. Antimicrobial activity of essential oils of Brazilian plants. *Phytother Res.* 4 (2) 82–84. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/ptr.2650040210>
- Lima, W. G.; Santos, R. C.; Câmara, C. A. G.; Câmara, M. P. S.; Melo Filho, P. A. 2008. Citronella oil inhibits cotton ramulosis in controlled conditions. *Pest Techn.* 2 (1) 24-27. [http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSBOnline/images/0812/PT\\_2\(1&2\)/PT\\_2\(1\)24-27o.pdf](http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSBOnline/images/0812/PT_2(1&2)/PT_2(1)24-27o.pdf)
- Lorenzi, H., Matos, F. J. A. 2002. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas. Ed: Nova Odessa, São Paulo. Instituto Plantarum. 512p.
- Mahato, A.; Mondal, B.; Dhakre, D. S.; Khatua, D. C. 2014. *In vitro* sensitivity of *Sclerotium rolfsii* towards some fungicides and botanicals. *Scholars Acad. J. Biosci.* 2 (7) 467-471. <https://journals.indexcopernicus.com/search/article?articleId=1787973>
- Medeiros, R. T. S.; Gonzalez, E.; Felicio, R. C.; Felicio, J. D. 2011. Evaluation of antifungal activity of *Pittosporum undulatum* L. essential oil against *Aspergillus flavus* and aflatoxin production. *Ciênc agrotec.* 35 (1) 71-76. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542011000100008>
- Mendes, S.S.; Bomfim, R.R.; Jesus, H.C.R.; Alves, P.B. Blank, A.F.; Estevam, C.S.; Antonioli, A.R.; Thomazzi, S. M. 2010. Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Lippia gracilis* leaves. *J. Ethnopharmacol.* 129, 391–397. <https://doi.org/10.1016/j.jp.2010.04.005>
- Michereff, S. J.; Andrade, D. E. G. T.; Peruch, L. A. M.; Menezes, M. 2005. Importância dos patógenos e das doenças radiculares em solos tropicais. In: Michereff, S. J.; Andrade, D. E. G. T.; Menezes, M. *Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais*. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco. 1-18.
- Morão, R. P., Almeida, A. C., Martins, E. R., Prates, J. P. B., Oliveira, F. D. 2016. Constituintes

químicos e princípios farmacológicos do óleo essencial de alecrim pimenta (*Lippia origanoides*). Unimontes Cient. 18 (1) 74 – 81.

<http://www.ruc.unimontes.br/index.php/unicientifica/article/view/372>

Oliveira, A. P.; Santos, A. A.; Santana, A. S.; Lima, A. P. S.; Melo, C. R.; Santana, E. D. R.; Sampaio, T. S.; Blank, A. F.; Araújo, A. P. A.; Cristaldo, P. F.; Bacci, L. 2018. Essential oil of *Lippia sidoides* and its major compound thymol: Toxicity and walking response of populations of *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). Crop Prot. 112 (2018) 33–38. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2018.05.011>

Paret, M. L.; Cabos, R.; Kratky, B. A.; Alvarez, A. M. 2010. Effect of plant essential oils on *Ralstonia solanacearum* Race 4 and bacterial wilt of edible ginger. Plant Dis 94:521-527. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-94-5-0521>

Queiroz, M. R. A.; Almeida, A. C.; Andrade, V. A.; Lima, T. S.; Martins, E. R.; Figueiredo, L. S. Careli, R. T. 2014. Avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial de *Lippia origanoides* frente à *Staphylococcus* sp. isolados de alimentos de origem animal. Rev Bras Plantas Med. 16 (3): 737-743. [http://dx.doi.org/10.1590/1983-084x/13\\_083](http://dx.doi.org/10.1590/1983-084x/13_083).

Rajkumar, S.; Jebanesan, A. 2010. Chemical composition and larvicidal activity of leaf essential oil from *Clausena dentata* (Willd) M. Roam. (Rutaceae) against the chikungunya vector, *Aedes aegypti* Linn. (Diptera: Culicidae). J. Asia Pac. Entomol. 13, 107–109. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2010.02.001>

Sarrazin, S. L. F.; Silva, L. A.; Assunção, A. P. F.; Oliveira, R. B.; Calao, V. Y. P.; Silva, R.; Stashenko, E. E.; Maia, J. G. S.; Mourão, R. H. V. 2015. Antimicrobial and Seasonal Evaluation of the Carvacrol-Chemotype Oil from *Lippia origanoides* Kunth. J Molecul. 20: 1860-1871. <http://doi:10.3390/molecules20021860>

Sellamuthu, P. S., Sivakumar, D., Soundy, P. 2013. Antifungal activity and chemical

composition of thyme, peppermint and citronella oils in vapor phase against avocado and peach postharvest pathogens. *J. Food Saf.* 33, 86 - 93. <https://doi.org/10.1111/jfs.12026>

Taiz, L.; Zeiger, E. 1998. Plant defenses: surface protection and secondary metabolites. *Plant Physiology*, Sunderland: Sinauer Associates, 2<sup>a</sup> ed. p. 350-353.

Teixeira, M. L. 2013. Óleos essenciais de *Lippia origanoides* Kunth. e *Mentha spicata* L.: composição química, potencialidades biológicas e caracterização das estruturas secretoras. 123f. Dissertação (Agroquímica) Programa de Pós-Graduação em Agroquímica. Universidade Federal de Lavras. UFLA. Lavras, MG. [http://repositorio.ufla.br/bitstream/1/670/3/DISSERTACAO\\_%C3%93leos%20essenciais%20de%20Lippia%20origanoides%20Kunth.%20e%20Mentha%20spicata%20L.PDF](http://repositorio.ufla.br/bitstream/1/670/3/DISSERTACAO_%C3%93leos%20essenciais%20de%20Lippia%20origanoides%20Kunth.%20e%20Mentha%20spicata%20L.PDF)

Van Den Dool, H.; Kratz, P. D., *J. Chromatogr.* 1963. A, 11, 463-471.

Wang, X., Liu, W., Xin, C., Zheng, Y., Cheng, Y., Sun, S., Li, R., Zhu, X., Dai, S. Y., Rentzepis, P. M., Yuan, J. S. 2016. Enhanced limonene production in cyanobacteria reveals photosynthesis limitations. *Proc Natl Acad Sci USA.* 113 (50) 14225-14230. <https://doi.org/10.1073/pnas.1613340113>

Wannes, W. A.; Mhamdi, B.; Sriti, J.; Jemia, M. B.; Ouchikh, O.; Hamdaoui, G.; Kchouk, M. E.; Marzou, B. 2010. Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf, stem and flower. *Food Chem. Toxicol.*, 48, 1362–1370. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.03.002>

## **Conclusões Gerais**

---

## CONCLUSÕES GERAIS

- A composição química dos óleos essenciais identificou os seguintes constituintes majoritários: timol (*L. sidoides*); óxido piperitenona (*L. lasiocalicyna*); borneol (*L. origanoides*); carvacrol (*L. origanoides* – Jatobá); sabineno (*M. suaveolens*);  $\beta$ -sabineno (*C. sonderianus*) e; estragol (*C. zehntneri*);
- O fungo *S. rolfsii* é altamente sensível aos óleos essenciais de *L. sidoides*, *L. origanoides* – Jatobá, e *C. zehntneri in vitro*;
- No tratamento de sementes, o fungo *S. rolfsii* é sensível aos óleos de *L. sidoides*, *L. origanoides* e *C. zehntneri*, *in vitro* e *in vivo*, especialmente aos de *L. sidoides* e *L. origanoides*;
- O tratamento de sementes com o óleo essencial de *L. sidoides*, *L. origanoides* e *C. zehntneri* é efetivo no controle *in vivo* de *S. rolfsii* na concentração de 4,0 ml kg<sup>-1</sup> em sementes de feijão-caupi. Concentrações maiores interferem negativamente na germinação;
- A viabilidade dos esclerócios de *S. rolfsii* é totalmente anulada quando estas estruturas são submetidas à biofumigação com óleos de *L. sidoides*, *L. origanoides* e *C. zehntneri* nas concentrações iguais e superiores a 3,18  $\mu$ l placa<sup>-1</sup>.
- A murcha de esclerócio, causada por *S. rolfsii* é potencialmente controlada pela biofumigação do solo com óleos essenciais de *L. sidoides*, *L. origanoides* e *C. zehntneri*, sendo o melhor nível de controle obtido com *L. sidoides*.