

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO GRANDE DO NORTE – UERN
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS – FANAT
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS NATURAIS –
PPGCN MESTRADO EM CIÊNCIAS NATURAIS – MCN

THALYNE NATHANYELE DA SILVA OLIVEIRA

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E ANTIBIOFILME DO ÓLEO
ESSENCIAL DE *Lippia gracillis* Schauer L. SOBRE FUNGOS
FITOPATOGÊNICOS

MOSSORÓ-RN

2020

THALYNE NATHANYELE DA SILVA OLIVEIRA

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E ANTIBIOFILME DO ÓLEO
ESSENCIAL DE *Lippia gracillis* Schauer L. SOBRE FUNGOS
FITOPATOGÊNICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais (PPGCN), da Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Ciências Naturais.

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Mayron Alves de Vasconcelos.

COORIENTADORA:

Prof^ª. Dra. Marciana Bizerra de Morais.

Mossoró-RN

2020

© Todos os direitos estão reservados a Universidade do Estado do Rio Grande do Norte. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do(a) autor(a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu(a) respectivo(a) autor(a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

Catálogo da Publicação na Fonte.
Universidade do Estado do Rio Grande do Norte.

D229a DA SILVA OLIVEIRA, THALYNE NATHANYELE
ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E ANTIBIOFILME DO
ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia gracillls* Schauer L. SOBRE
FUNGOS FITOPATOGÊNICOS. / THALYNE
NATHANYELE DA SILVA OLIVEIRA. - MOSSORÓ, 2020.
41p.

Orientador(a): Prof. Dr. Mayron Alves de Vasconcelos.
Dissertação (Mestrado profissional em Biologia).
Universidade do Estado do Rio Grande do Norte.

1. PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
NATURAIS. I. Alves de Vasconcelos, Mayron. II.
Universidade do Estado do Rio Grande do Norte. III. Título.

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pela Diretoria de Informatização (DINF), sob orientação dos bibliotecários do SIB-UERN, para ser adaptado às necessidades da comunidade acadêmica UERN.

THALYNE NATHANYELE DA SILVA OLIVEIRA

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E ANTIBIOFILME DO ÓLEO
ESSENCIAL DE *Lippia gracillis* Schauer L. SOBRE FUNGOS
FITOPATOGÊNICOS**

Dissertação do Programa de Pós-Graduação
em Ciências Naturais (PPGCN), na linha de
pesquisa Tecnologia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Mayron Alves de
Vasconcelos.

Coorientadora: Prof^a. Dra. Marciana Bizerra
de Moraes.

Aprovado em: __/__/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Mayron Alves de Vasconcelos (Orientador)
Universidade do Estado do Rio Grande do Norte (UERN)

Profa. Dra. Cynthia Cavalcanti de Albuquerque
Universidade do Estado do Rio Grande do Norte (UERN)

Pesq. Dra. Marciana Bizerra de Albuquerque
Universidade do Estado do Rio Grande do Norte (UERN)

Profa. Dr . Edson Holanda Teixeira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Crescimento micelial de *F. oxysporum* (a), *F. solani* (b), *C. gloesporioides* (c) e *C. lindemuthianum*(d). na presença de diferentes concentrações do óleo essencial da *L. gracilis*. “*” p<0,05 demonstra diferença significativa em relação ao controle.....19

Figura 2. Porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) de *F. oxysporum* (a), *F. solani* (b), *C. gloesporioides* (c) e *C. lindemuthianum* (d) na presença de diferentes concentrações do óleo essencial da *L. gracilis*

.....
20

Figura 3. Crescimento vegetativo de *F. oxysporum* (a), *F. solani* (b), *C. gloesporioides* (c) e *C. lindemuthianum* (d) na presença de diferentes concentrações de óleo essencial de *L. gracilis*. CN – Controle negativo (BD); CP – Controle positivo (100 mM de peróxido de hidrogênio).

.....
21

Figura. 4. Crescimento vegetativo de *F. oxysporum* na presença de diferentes concentrações de carvacrol (a) e timol (b). CN – Controle negativo (BD); CP – Controle positivo (100 mM de peróxido de hidrogênio)..... 22

Figura 5. Efeito do óleo essencial de *L. gracilis* na formação de biomassa do biofilme de *F. oxysporum* (a), *F. solani* (b), *C. gloesporioides* (c) e *C. lindemuthianum* (d). CN – Controle negativo (BD); CP – Controle positivo (100 mM de peróxido de hidrogênio). “*” p<0,05 demonstra diferença significativa em relação ao controle.....23

Figura 6. Efeito do óleo essencial de *L. gracilis* sobre a atividade metabólica dos biofilmes de *F. oxysporum* (a), *F. solani* (b), *C. gloesporioides* (c) e *C. lindemuthianum* (d). CN – Controle negativo (BD); CP – Controle positivo (100 mM de peróxido de hidrogênio). “*” p<0,05 demonstra diferença significativa em relação ao controle.....24

Figura 7. Efeito dos monoterpenos carvacrol (a) e timol (b) sobre a formação de biomassa do biofilme de *F. oxysporum*. CN – Controle negativo (BD); CP – Controle positivo (100 mM de peróxido de hidrogênio). “*” p<0,05 demonstra diferença significativa em relação ao controle..... 25

Figura 8. Efeito do carvacrol (a) e timol (b) sobre a atividade metabólica do biofilme de *F. oxysporum*. CN – Controle negativo (BD); CP – Controle positivo (100 mM de peróxido de hidrogênio). “*” p<0,05 demonstra diferença significativa em relação ao controle.....25

Figura 9. Eletromicrografias do biofilme de *F. oxysporum* obtidos através de microscopia eletrônica de varredura. Biofilme de *F. oxysporum* desenvolvido em meio Batata Dextrose (a - c) e desenvolvido na presença do óleo essencial de *L. gracilis* a 0,0625% (d -f). Magnificações de 300, 1500 e 3000 x.....26

Figura 10. Eletromicrografias do biofilme de *C. gloesporioides* obtidos através de Microscopia Eletrônica de Varredura. Biofilme de *C. gloesporioides* desenvolvido em meio Batata Dextrose (a e b); e desenvolvido na presença de 0,015 % do óleo essencial de *L. gracilis* (c e d). Magnificações de 300 e 1500x.....27

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BOD – Biochemical Oxygen Demand

BDA – Batata Dextrose Ágar

BD – Batata Dextrose

DMSO -

Dimetilsulfóxido

MTS – sal 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio.

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1. FUNGOS FITOPATOGÊNICOS.....	2
2.1.1. GÊNERO <i>Colletotrichum</i>	2
2.1.2. GÊNERO <i>Fusarium</i>	5
2.1.3. IMPACTOS ECONÔMICOS CAUSADOS PELOS FUNGOS FITOPATOGÊNICOS....	8
2.1.4. MÉTODOS DE CONTROLE DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS.....	8
2.1.5. BIOFILMES FÚNGICOS.....	9
2.1.6. ÓLEOS ESSENCIAIS.....	11
2.1.7. <i>Lippia gracillis</i> Schauer L.....	13
3. METODOLOGIA.....	15
3.1. EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>L. gracillis</i> E OBTENÇÃO DOS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS 15	
3.2. MICRORGANISMOS E CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	15
3.3. ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>L. gracillis</i>	15
3.3.1. ATIVIDADE DO ÓLEO DE <i>L. gracillis</i> SOBRE O CRESCIMENTO MICELIAL.....	15
3.3.2. ATIVIDADE DO ÓLEO DE <i>L. gracillis</i> SOBRE O CRESCIMENTO VEGETATIVO.....	16
3.4. ATIVIDADE DO ÓLEO DE <i>L. gracillis</i> SOBRE A FORMAÇÃO DE BIOFILMES.....	16
3.5. ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E ANTIBIOFILME DOS MONOTERPENOS TIMOL E CARVACROL 7	
.....	17
3.6. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	17
3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	18
4. RESULTADOS.....	19
4.1. ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO ESSENCIAL SOBRE O CRESCIMENTO MICELIAL	19
4.2. ATIVIDADE DO ÓLEO DE <i>L. gracillis</i> SOBRE O CRESCIMENTO VEGETATIVO DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS	21
4.3. ATIVIDADE DO CARVACROL E TIMOL SOBRE O CRESCIMENTO VEGETATIVO DE <i>F. oxysporum</i>	22
4.4. ATIVIDADE DO ÓLEO DE <i>L. gracillis</i> SOBRE A FORMAÇÃO DE BIOFILMES FÚNGICOS	23
4.5. ATIVIDADE DO CARVACROL E TIMOL SOBRE A FORMAÇÃO DE BIOFILMES DE <i>F. oxysporum</i>	25

4.6. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE BVARREDURA DOS BIOFILMES FÚNGICOS
TRATADOS COM ÓLEO ESSENCIAL DE *L. gracillis*

27

5. DISCUSSÃO.....	28
6. CONCLUSÃO.....	32
REFERÊNCIAS.....	33

RESUMO

Fungos fitopatogênicos são, em geral, responsáveis por causar doenças em cultivos economicamente importantes, isso pode ocasionar perdas irreparáveis para as culturas contaminadas. Comumente é feito o uso indiscriminado de agrotóxicos, diante disso surge a necessidade de controlar as infecções fúngicas de uma forma menos impactante ao meio ambiente e que não prejudique a qualidade do alimento. Dado o exposto, o presente trabalho tem por objetivo avaliar o efeito antifúngico e antibiofilme do óleo essencial de *Lippia gracillis*, e seus constituintes majoritários, sobre fungos fitopatogênicos. A atividade antifúngica do óleo essencial foi avaliada sobre as espécies fúngicas *Colletotrichum gloesporioides*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Fusarium oxysporum* e *Fusarium solani*, através da inibição do crescimento micelial e germinação de esporos. Além disso, foi avaliada a capacidade de inibir a formação dos biofilmes fúngicos através da quantificação da biomassa total do biofilme pela coloração com cristal de violeta, análise da atividade metabólica e microscopia eletrônica de varredura. Além do óleo essencial, as atividades antifúngicas e antibiofilme dos monoterpenos timol e carvacrol foram avaliadas sobre *F. oxysporum*. O óleo apresentou atividade antifúngica significativa quanto a inibição do crescimento fúngico e inibição da formação de biofilmes na maioria das concentrações testadas. No que diz respeito a atividade antifúngica dos seus constituintes majoritários (carvacrol e timol), ambos inibiram de maneira significativa o crescimento fúngico e a formação de biofilmes nas maiores concentrações. Em conclusão, os resultados apresentados neste trabalho mostram o potencial do óleo essencial extraído de folhas de *L. gracilis* e de seus componentes majoritários como compostos antifúngicos e capazes de inibir a formação de biofilme dos fungos do gênero *Fusarium* e *Colletotrichum*.

Palavras-chave: Fungos fitopatogênicos; *Lippia gracillis*; óleos essenciais; Agrotóxico; Biofilmes.

ABSTRACT

Plant pathogenic fungi are generally responsible for causing disease in economically important crops, which can cause irreparable losses to contaminated crops. The indiscriminate use of pesticides is commonly made, so there is a need to control fungal infections in a way that is less environmentally friendly and does not harm the quality of the food. Given the above, this study aims to evaluate the antifungal and antibiofilm effect of *Lippia gracillis* essential oil and its major constituents on phytopathogenic fungi. The antifungal activity of the essential oil was evaluated on the fungal species *Colletotrichum gloesporioides*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Fusarium oxysporum* and *Fusarium solani* by inhibiting mycelial growth and spore germination. In addition, the ability to inhibit the formation of fungal biofilms by quantifying the total biofilm biomass by violet crystal staining and metabolic analysis was evaluated. In addition to the essential oil, the antifungal and antibiofilm activities of monoterpenes timol and carvacrol were evaluated on *F. oxysporum*. The oil was able to obtain positive results regarding antifungal and antibiofilm inhibition, where only at the lowest concentrations the inhibition was not significant. As for monoterpenes activities, they were able to inhibit fungal growth and biofilm biomass formation in the highest concentrations. In conclusion, this work showed the potential of the essential oil extracted from *L. gracilis* leaves and its major components as antifungal compound and capable of inhibiting the biofilm formation of *Fusarium* and *Colletotrichum* fungi.

Keywords: Phytopathogenic fungi; *Lippia gracillis*; essential oils; Pesticide; Biofilms.

1. INTRODUÇÃO

Muitas doenças assolam os cultivos de plantas de alto valor agregado, isso pode influenciar diretamente na qualidade do produto. Dentre os principais problemas que podem influenciar na qualidade dos grãos e frutos estão as fitopatologias, que podem surgir desde o plantio da semente até o transporte e armazenamento (SENHOR *et al.*, 2009). Muitos microrganismos são capazes de sobreviver mesmo em ambientes mais hostis, formando comunidades conhecidas como biofilmes. Em qualquer lugar que existam microrganismos, água e uma superfície, pode ocorrer a formação de biofilmes.

Biofilmes são comunidades microbianas altamente estruturadas e hidratadas, constituídas por células sésseis incorporadas a uma matriz polimérica extracelular (COSTERTON *et al.*, 1999). Quando comparados às células planctônicas (forma livre de desenvolvimento do microrganismo no hospedeiro ou material inerte), os biofilmes geralmente apresentam-se mais resistentes aos agentes antimicrobianos e este aumento da resistência tem um impacto considerável no tratamento de infecções relacionadas a biofilme (DONLAN *et al.*, 2002).

Os fungos filamentosos têm adaptações que permitem que eles cresçam em superfícies, o que é demonstrado pelo seu modo de nutrição por absorção, sua secreção de enzimas extracelulares para digerir moléculas complexas e seu modo de crescimento apical, por hifas. Desse modo, esses fungos são excelentes candidatos à formação de biofilmes. Uma vez formado no biofilme, os microrganismos apresentam características distintas, como maior tolerância a estresses químicos e físicos, melhoria na utilização de nutrientes e na comunicação celular. (MAHMOUD; O'TOOLE, 2001).

Em virtude dos grandes problemas que os microrganismos têm causado, de ordem econômica e a nível de saúde animal e vegetal, o estudo de diferentes óleos essenciais e suas atividades antimicrobianas vem se intensificando ao longo do tempo. A preocupação dos consumidores em relação ao ambiente, à qualidade do alimento e aos efeitos colaterais dos sintéticos têm incentivado os pesquisadores quanto a busca de alternativas para o controle de pragas, como os óleos essenciais obtidos de plantas e seus compostos constituintes (MOREIRA *et al.*, 2007; RAJENDRAN; SRIRANJINI, 2008).

As plantas apresentam inúmeras substâncias ativas, que as tornam uma fonte particularmente promissora de novas moléculas potencialmente úteis ao homem. Dentre as substâncias que as plantas produzem por meio do metabolismo secundário destacam-se os óleos essenciais (OLIVEIRA, 2012). Óleos essenciais são substâncias concentradas,

que podem ser extraídas a partir de flores, frutos, sementes, folhas, raízes e outras partes das plantas por diferentes métodos de extração. O óleo essencial é uma mistura complexa de substâncias voláteis lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas e de baixo peso molecular (LUBBE; VERPOORTE, 2011). Podem ser chamados de óleos voláteis, óleos estéreos ou essenciais devido a algumas de suas características físico-químicas como volatilidade, solubilidade em solventes orgânicos (como o éter) e aroma intenso, muitas vezes agradável (MATTOS et al., 2007). Esses óleos podem ser classificados em terpenos, compostos terpenóides oxigenados, compostos benzenóides e compostos contendo nitrogênio e/ou enxofre (CASTRO et al., 2004; DONELIAN, 2004; SONWA, 2000).

Dentre as plantas produtoras de óleos essenciais, destaca-se o gênero *Lippia*, pertencente à família Verbenaceae. Alguns estudos de caráter farmacológico têm demonstrado que o extrato metanólico das folhas da *L. gracilis* apresenta propriedades anti-inflamatórias e antinociceptivas (GUIMARÃES, et al., 2012), e que o óleo essencial das folhas possui ação antimicrobiana, larvicida e moluscicida (*apud*. FERRAZ, et al., 2013), além de apresentar efeito citotóxico em células tumorais (RIBEIRO, et al., 2012). O óleo essencial de *L. gracilis* apresenta como componentes que aparecem com maior frequência o limoneno, β -cariofileno, p-cimeno, cânfora, linalool, α -pineno, 1-8 cineol, humuleno, γ -terpineno, timol e carvacrol (PASCUAL et al., 2001; CAVALCANTI et al., 2010).

O crescente interesse dos consumidores em produtos elaborados a partir de ingredientes funcionais e, sobretudo proveniente de fontes naturais, permite cada vez mais a inserção dos óleos essenciais na indústria, visto que os mesmos possuem atividades nas defesas contra microrganismos e também são importantes em outros setores, como na indústria alimentícia e farmacêutica. Atualmente, a crescente exigência por produtos vegetais de qualidade, livres de resíduos químicos acima do exigido nas leis de diversos países, incentiva a busca por substâncias alternativas (CARVALHO et al., 2008). Os óleos essenciais estão relacionados com diversas funções necessárias à sobrevivência vegetal, exercendo papel fundamental na defesa contra microrganismos (SIQUI et al., 2000). Nesse sentido, o presente trabalho tem por objetivo avaliar a atividade antifúngica e antibiofilme do óleo essencial da *Lippia gracillis* sobre a inibição de fungos fitopatogênicos, além disso avaliar a atividade de compostos majotirários (timol e carvacrol).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. FUNGOS FITOPATOGÊNICOS

Os organismos fitopatogênicos são responsáveis por causar doenças nas plantas, ocasionando distúrbios em seu metabolismo celular, agindo como predadores propriamente ditos, pois utilizam os nutrientes do hospedeiro para o seu próprio crescimento. De fato, organismos fitopatogênicos, tais como fungos, nematoides, bactérias e vírus causam uma quantidade significativa de doenças em plantas que levam a perdas inestimáveis para as culturas (MONTESINOS, 2003; HORST, 2008).

Segundo Pozza *et al.* (1999), os fungos são responsáveis por 70 % das doenças que causam danos em várias culturas, reduzindo a sua produtividade. Além disso, são responsáveis por perdas consideráveis em culturas economicamente importantes (FLETCHER *et al.*, 2006), e estão associados à indução do apodrecimento de frutas e verduras pós-colheita, diminuindo o conteúdo nutricional e aproveitamento destes alimentos (RAY; RAVI, 2005).

Estudos têm demonstrando que fungos fitopatogênicos, como fungos do gênero *Fusarium* e *Colletotrichum*, podem ser controlados com eficiência, por meio da utilização de produtos naturais extraídos de vegetais (SOUZA *et al.*, 2007; CELOTO *et al.*, 2008). Nesse sentido, a busca por novos agentes antifúngicos naturais capazes de prevenir ou controlar a disseminação dos fungos fitopatogênicos tem se tornado uma necessidade crescente.

2.1.1. Gênero *Colletotrichum*

O gênero *Colletotrichum* sp. é um dos mais importantes entre os fungos fitopatogênicos do mundo, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais. Este gênero envolve espécies que causam doenças de expressão econômica em leguminosas, cereais, hortaliças e culturas perenes, incluindo diversas frutíferas (SERRA *et al.*, 2008).

Entre os fungos existentes no mundo foram encontradas 8.508 espécies de *Colletotrichum* sp., sendo no Brasil registrados 59 espécies (SBML, 2010; EMBRAPA, 2010). O gênero *Colletotrichum* sp. Já foi encontrado em 154 hospedeiras, dentre eles, no pimentão, cravo da Índia, mamão, café, pepino, eucalipto, algodão jabuticaba, jiló, batata, na maioria destas o fungo ocorreu em sementes, causando doenças como antracnose, mancha foliar, sarna, podridão dos frutos (EMBRAPA, 2010).

A antracnose causada por espécies de *Colletotrichum* é a principal doença de frutos em pós-colheita. O sintoma típico da doença é caracterizado por lesões arredondadas, grandes, necróticas e bordos ligeiramente elevados com o centro dos tecidos deprimidos, onde são produzidas massas de conídios de coloração alaranjada (BAILEY et al., 1992), podendo ocorrer uma podridão mole nos frutos, prejudicando a sua comercialização (LIMA FILHO et al., 2003). A doença pode ocasionar prejuízos que variam em função do grau de suscetibilidade da planta hospedeira e das condições ambientais (SERRA et al. 2008). A antracnose pode ser altamente devastadora, proporcionando perdas de até 100% na produção quando os fatores de cultivo estão suscetíveis, o ambiente estiver favorável ao patógeno e as sementes infectadas estiverem simultaneamente presentes durante o período de cultivo (SILVA, 2004).

Entre as medidas de controle desse patógeno, destacam-se: o uso de sementes certificadas, rotação de cultura, controle químico e a resistência genética, sendo esta a mais eficaz, por minimizar os custos de produção e reduzir os danos causados ao ambiente (SILVA, 2004). O gênero foi recentemente eleito o oitavo grupo mais importante de fungos patogênicos vegetais do mundo, com base na percepção de importância científica e econômica (DEAN et al. 2012). Dentre os fungos do gênero, destacam-se o *C. gloeosporioides* e o *C. lindemuthianum*.

O fungo *C. lindemuthianum* é capaz de infectar folhas, caule, ramos, vagens e sementes de plantas de feijoeiro em todos os estágios de desenvolvimento (Hall, 1991). Plantas jovens geralmente são mais suscetíveis à infecção pelo patógeno do que as plantas adultas por possuírem tecidos menos lignificados (Hall, 1991). Nas plântulas, os sintomas da antracnose são lesões escuras nos cotilédones e no hipocótilo (Hall, 1991). Em plantas adultas, as lesões ocorrem com maior frequência nos pecíolos e nas nervuras (Hall, 1991). Tais regiões apresentam manchas de coloração marrom-escuro ou pardas que atingem inicialmente as nervuras principais, chegando às secundárias à medida que a doença progride (Hall, 1991).

A espécie *C. gloeosporioides* ataca plantas em mais de 50 famílias, durante todas as fases do cultivo (GAVA; TAVARES, 2007). Estes fungos têm a capacidade de persistir no solo durante longos períodos, até encontrar as condições favoráveis para desenvolver-se (OLIVEIRA, 2010). A partir da fonte de inóculo, representadas por restos de cultura e matéria orgânica, pode ocorrer a disseminação das estruturas fúngicas, realizada pela água, do movimento do solo e do transporte de material infectado como mudas e sementes (OLIVEIRA, 2010). A disseminação dos esporos de *C. gloeosporioides* ocorre

principalmente pelo vento e períodos chuvosos com elevada umidade relativa (90%) (TAVARES, 1995).

C. gloeosporioides f. sp. *cepa* é um fungo mitosporico que produz conídios hialinos e unicelulares (ZAMBOLIM; JACCOUD FILHO, 2000). Os conídios são unicelulares e cilíndricos, com as listras obtusas e asseptados (KIMATI et al., 1997). O fungo sobrevive no solo em restos de cultura deixados no campo e também nas sementes. Os conídios são disseminados dentro do campo pelo vento, respingos da água da chuva ou da irrigação por aspersão, e pelos implementos agrícolas. A longa distância, sua disseminação ocorre através de bulbos e sementes infectadas ou contaminadas. Temperaturas entre 23°C e 30°C e umidade relativa alta por um período prolongado são condições que favorecem o desenvolvimento da doença (GAVA; TAVARES, 2007). Os conídios germinam e afetam a cultura, geralmente a uma temperatura de 23°C a 30°C, penetrando nos estômatos da planta, e durante a infecção são produzidas fitotoxinas como metabolitos secundários e enzimas que degradam a parede celular.

A principal estratégia de controle deste fungo é por meio de fungicida, sendo esta técnica utilizada na maior parte dos cultivos (HADDAD, 2003). Esse controle é realizado mediante a aplicação de fungicidas sistemáticos onde os mais usados são e tiofanato metílico (benzimidazol), folpete (dicarboximida) e quintozeno (cloroaromático) (GAVA; TAVARES, 2007). A utilização dos fungicidas tende a aumentar os custos de produção e, em algumas ocasiões, pode afetar a saúde humana especialmente do agricultor, além de contribuir com a contaminação ambiental (CARVALHO; PIVOTO, 2011).

2.1.2. Gênero *Fusarium*

A forma anamórfica de *Fusarium* sp. pertence ao Reino Fungi, Divisão Deuteromycotina, classe dos Hyphomycetes, ordem Moniliales, família Tuberculariaceae. O gênero é representado por 1414 espécies, 348 variedades e 140 *formae speciales* descritas em literatura (INDEX FUNGORUM, 2010). Diversos sistemas de classificação para o gênero já foram propostos. Os mais usados são o de Booth, que reconhece 51 espécies distribuídas em 12 seções, bem como o proposto por Snyder e Hansen, com 9 amplas espécies. *Formae speciales* constituem grupos dentro das espécies distinguíveis apenas pela especificidade de hospedeiros (PORTAL PATOLOGIA DE SEMENTES, 2010).

A identificação de espécies de *Fusarium* sp. é baseada na morfologia dos macro e microconídios, conidióforos, clamidosporos e na disposição dos conídios no conidióforo. Marcante é o fato de as características morfológicas sofrerem influência do ambiente e das condições nutricionais do substrato. Especialistas no gênero utilizam meios de cultura e condições padronizadas para identificação (PORTAL PATOLOGIA DE SEMENTES, 2010).

Foi relatada a presença das várias espécies de *Fusarium* sp. associadas a várias espécies de plantas, no Brasil, como: abacate (*Persea sp. mill*), abacaxi (*Ananas comosus*), alface (*Lactuca sativa*), algodão (*Gossypium herbaceum* L.), alho (*Allium sativum*), bananeira (*Musa paradisiaca* L.), angico (*Anadenathera peregrina* spg), arroz (*Oryza sativa* L.), dendê (*Elaeis guineensis*), manga (*Mangifera indica*), milho (*Zea mays*), quibo (*Hibiscus esculentus*), uva (*Vitis vinifera* L.), trigo (*Triticum aestivum*), soja (*Glycine max*), ervilha (*Pisum sativum* L.) (MENDES; URBEN, 2010).

Espécies de *Fusarium* sp. incluem importantes fitopatógenos, causadores de murchas, podridões, morte de plântulas, aborto de flores, podridões de armazenamento e outras doenças. De ocorrência cosmopolita, frequentemente estão associados com sementes. Algumas espécies são produtoras de importantes micotoxinas (PORTAL PATOLOGIA DE SEMENTES, 2010). Os fungos deste gênero são responsáveis pela fusariose, que se trata de uma das principais doenças que ocorre nos cultivos de todo o Brasil (VERZIGNASSI et al., 2009). As fusarioses causam danos externos como curvatura ou morte do ápice do caule, amarelamento generalizado a lesões em pedúnculos dos frutos, mudas, folhas, entre outros (GOES, 2005).

As espécies *F. oxysporum* e *F. solani* ganham destaque entre as principais espécies do gênero, como fitopatógenos causadores de murchas e apodrecimento das raízes, respectivamente, gerando bastante preocupação justamente devido aos danos econômicos causados no setor agrícola e por sua distribuição (GHINI; NAKAMURA, 2001). Dentre os fitopatógenos fúngicos mais preocupantes estão àqueles causadores de murchas vasculares, fungos habitantes do solo e que atacam o sistema radicular de plantas, sendo um dos principais agentes etiológicos o fungo *Fusarium oxysporum*. (REIS; BOITEUX, 2007; SOUZA et al., 2010; BARBOZA et al., 2013).

F. solani é fungo fitopatogênico que causa várias doenças em determinadas culturas como apodrecimento do caule de ervilha, síndrome da morte súbita da soja, podridão do pé de feijão e podridão seca de batata (LUGINBUHL, 2010). A morfologia da espécie *F. solani* (Mart.) Sacc. foi no princípio descrita pelo pesquisador

Von Martius em 1842 com o nome de *Fusisporium solani* de tubérculos de batata, *solanum tuberosum*. Com o passar do tempo à espécie de fungo foi mudada para o gênero *Fusarium* pelo micologista A. Saccardo em 1881, e *F. solani* foi descrito por Snyder e Hansen em 1941, que completa um amplo campo de espécies distribuídas por todo o mundo que apodrece raízes e caules em várias espécie de plantas (LUGINBUHL, 2010).

F. oxysporum f. apresenta micélio septado, aéreo, difuso e produz três tipos de esporos assexuais: microconídios, macroconídios e clamidósporos (AGRIOS, 2005). Os microconídios são formados em monofialides curtas, de formato oval a elipsoide, unicelulares, uninucleados e frequentemente produzidos pelo fungo principalmente dentro dos vasos das plantas infectadas; os macroconídios são formados em conidióforos ou na superfície de esporodóquio, gradualmente pontiagudo nas extremidades, fusóide, com três a cinco septos e comumente encontrado na superfície das plantas mortas pelo patógeno, atestando sua eficiência como microrganismo saprofítico (AGRIOS, 2005; LESLIE; SUMMERELL, 2006).

Os clamidósporos são resultantes da transformação de hifas podendo ter uma a duas células, de paredes espessas, duplas e rugosas, formados terminal ou intercaladamente no micélio e produzidos pelo patógeno como estruturas especializadas que resistem às condições ambientais adversas e permanecem viáveis no solo na ausência do hospedeiro por muitos anos (ALEXOPOULOS et al., 1996; LESLIE; SUMMERELL, 2006). Neste aspecto, durante a infecção, principalmente através de feridas ou por aberturas naturais na parede celular das raízes, o sucesso do desenvolvimento no hospedeiro é resultado de 11 um processo de colonização empregadas pelo fungo, que inclui produção de enzimas, toxinas e fatores de virulência (THATCHER et al., 2012; GAWEHNS et al., 2014). Por isso é importante ressaltar a adoção de medidas que impeçam a entrada do fungo, em áreas onde ainda não foi constatada a murcha de fusário.

Os sintomas mais evidentes da doença são o amarelecimento das folhas basais com perda da turgidez e que podem levar ao crestamento no limbo. Estes sintomas podem progredir para as demais folhas da planta e, dependendo da agressividade de alguns isolados, podem tronar-se necróticas rapidamente (WHEELER; RUSH, 2001; MA et al., 2013). O escurecimento dos vasos vasculares é resultado da oxidação e polimerização de hidroxifenóis e ação da oxidase, além do envolvimento da participação indireta das toxinas produzidas pelo fungo, o que causa aumento da permeabilidade das membranas

do hospedeiro e alterações no equilíbrio iônico e perda de eletrólitos pelas células (TAMARI; KAJI, 1954), ocasionando estresse oxidativo.

2.1.3. Impactos econômicos causados pelos fungos fitopatogênicos

Os fungos fitopatogênicos causam danos em culturas economicamente viáveis, trazendo prejuízo as mesmas, pois ocasionam perdas na produção e conseqüentemente reduzem a sua rentabilidade. A perda pós-colheita de frutos tropicais no Brasil situa-se na ordem de 30% dos produtos comercializados (TAVARES, 2004). Com alta umidade, frutas e vegetais frescos são suscetíveis ao ataque de fungos e bactérias fitopatogênicos, bem como a deterioração fisiológica durante o período entre a colheita e o consumo (ZAMBOLIM, 2002). Em geral, os agentes causadores de podridão em pós-colheita apresentam características comuns, que são a capacidade de se estabelecerem no fruto imaturo e permanecerem em estado latente, sem o aparecimento de sintomas, até que haja condições para que a infecção se manifeste (NERY-SILVA et al., 2001).

O Brasil destaca-se como o segundo maior produtor mundial de frutas, onde frutos de mamoeiro (*Carica papaya* L.) contribuem com uma produção de 1.450.000 toneladas métricas/ano e frutos cítricos (*Citrus* spp.) com 16.923.732 toneladas métricas/ano (FAO, 2002). Apesar dessa elevada produção de frutas tropicais, ocorre um grande volume de perdas, que corresponde em média a 30% do total produzido (BENATO, 1999).

As perdas pós-colheita podem ter causas diversas, dentre as quais se destacam as doenças (CHITARRA; CHITARRA, 1990), onde as ocasionadas por fungos ocorrem com maior frequência e atividade (BOOTH; BURDEN, 1986), sendo responsáveis por 80 a 90% do total de perdas causadas por fitopatógenos (GULLINO, 1994). Em frutos de mamão e laranja, esses fitopatógenos causam consideráveis perdas pós-colheita, podendo atingir 75% na fase de comercialização do mamão (PAULL et al., 1997) e 50% na de laranja (ECKERT, 1993).

As doenças pós-colheita podem iniciar no campo e ficarem latentes, manifestando-se somente após a colheita em condições ambientais favoráveis (GOMES, 1996). A penetração do hospedeiro pelo patógeno pode ocorrer diretamente via epiderme, pela cutícula intacta, bem como por ferimentos ou aberturas naturais na superfície dos frutos, como as lenticelas (ECKERT, 1980; ZAMBOLIM et al., 2002).

2.1.4. Métodos de controle dos fungos fitopatogênicos

Atualmente, o controle da maioria das doenças de plantas é realizado com o tratamento convencional com agrotóxicos. O uso destes produtos, a fim de combater pragas, doenças e plantas daninhas, traz efeitos imediatos, tais como a redução das perdas na produtividade e o aumento da oferta de alimentos (HUSSAR et al., 2004; COOPER; DOBSON, 2007). Apesar da significativa contribuição desses produtos para a produção agrícola, o uso contínuo e indiscriminado de agrotóxicos causa problemas ambientais como o surgimento de patógenos resistentes e a interrupção do controle biológico natural, ocasionando surtos de doenças e favorecendo o aparecimento de pragas secundárias (DINIZ et al., 2008; LEE et al., 2008; SOYLU et al., 2010). Problema que tende a se agravar, isso porque o ministério da agricultura liberou 239 agrotóxicos para utilização comercial, desde o início de janeiro de 2019, alguns deles inclusive, foram proibidos em outros países. Esse fato só tende a agravar a situação do cultivo, bem como do meio ambiente de forma geral.

De acordo com Fernandes Neto e Sarcinelli (2009) a maioria dos contaminantes químicos presentes em águas subterrâneas e superficiais está relacionada às fontes agrícolas, e os agrotóxicos assumem um lugar de destaque, devido à intensidade de seu consumo no Brasil. Diante do efeito negativo causado pelo uso constante de agrotóxicos, surge a necessidade da busca por novas estratégias e formas de controle para tentar minimizar a proliferação dos fungos fitopatogênicos nas culturas economicamente viáveis. A ideia é encontrar formas de controle que além de serem naturais, possuam pouca fitotóxicidade e tenham baixo custo. O controle alternativo de fungos fitopatogênicos tem sido discutido amplamente no contexto atual. Muitos produtos naturais, dentre os quais extratos e os óleos essenciais de plantas, apresentam potencial para a prevenção e tratamento de doenças em plantas.

2.1.5 BIOFILMES FÚNGICOS

Biofilmes podem ser conceituados como uma comunidade de microrganismos unidos em uma matriz de polimérica extracelular orgânica que estão aderidos a uma superfície. Assim, para que os biofilmes se formem é indispensável a presença de três ingredientes básicos: microrganismos, matriz extracelular e uma superfície biótica ou abiótica (DUNNE, 2002).

Biofilmes podem ser compostos por populações de uma única ou de múltiplas espécies de bactérias, fungos e/ou protozoários, sendo que os biofilmes mais comuns na natureza são compostos por duas ou mais espécies (JAY, 2005; IST, 2008). Quando formado por mais de uma espécie, elas podem viver em simbiose, onde uma facilita o crescimento e adesão da outra por meio de metabólitos ou podem competir por nutrientes e acumular metabólitos tóxicos o que limita a diversidade de espécies num biofilme (IST, 2008).

Os microrganismos formam o biofilme como estratégia para otimizar a sobrevivência, uma vez que são consideravelmente mais resistentes à remoção por agentes utilizados para limpeza e sanificação das indústrias alimentícias. Assim, são alvo de preocupação para indústria de alimentos por serem constituídos por microrganismos patogênicos ou deteriorantes, podendo ocasionar doenças nos consumidores e prejuízos econômicos. (KASNOWSKI et. al., 2010).

Os biofilmes geralmente apresentam-se mais resistentes aos agentes antimicrobianos e este aumento da resistência tem um impacto considerável no tratamento de infecções relacionadas a biofilme (DONLAN *et al.*, 2002).

Na formação desses biofilmes, se torna difícil eliminar microrganismos, pois ocorre um aumento da resistência dos mesmos a antibióticos e outros produtos sanitizantes, de modo que se faz necessário a busca por agentes que os elimine, sem torná-los resistentes. Os biofilmes são importantes reservatórios ambientais para alguns agentes patogênicos, o modo de crescimento destes biofilmes pode originar organismos com vantagens de sobrevivência em ambientes naturais e aumentar até a sua virulência (PARSEK; SINGH, 2003).

Os fungos filamentosos têm adaptações que permitem que eles cresçam em superfícies, o que é demonstrado pelo seu modo de nutrição por absorção, sua secreção de enzimas extracelulares para digerir moléculas complexas e seu modo de crescimento apical, por hifas. Desse modo, esses fungos são excelentes candidatos à formação de biofilmes. Uma vez formado no biofilme, os microrganismos ali presentes apresentam características distintas, como maior tolerância a estresses químicos e físicos, melhoria na utilização de nutrientes e na comunicação celular. (MAHMOUD; O'TOOLE, 2001).

Harding et al. (2009) demonstrou a capacidade de fungos filamentosos de formar biofilmes e a dividiu em 6 etapas, primeiramente a adesão de esporos, contendo apenas o contato do organismo com a superfície, em seguida, adesão ativa a superfície, a terceira etapa trata-se da formação de microcolônia, a quarta a maturação inicial, a quinta o

desenvolvimento reprodutivo, e a sexta, a dispersão. Uma das características da formação de biofilmes é a sua alta resistência a estresses biológicos, químicos e físicos, tornando essa comunidade microbiana mais suscetível à permanência do fungo no campo

Diversos trabalhos com óleos essenciais têm indicado o seu potencial no controle de bactérias (SILVA et al., 2010; DEMUNER et al., 2011; NASCIMENTO et al., 2011) e de fungos fitopatogênicos (VELOSO et al., 2012). A inibição do desenvolvimento de fungos pode ser tanto por sua ação direta, inibindo o crescimento micelial e a germinação de esporos, quanto pela indução de resistência a diversos patógenos (SCHWANESTRADA et al., 2003; DONLAPORN; SUNTORNSUK, 2010; DEUS et al., 2011; PERINI et al., 2011; SEIXAS et al., 2011; GARCIA et al., 2012; PASSOS et al., 2012). Contudo, trabalhos que tratam da atividade de óleos essenciais sobre a formação de biofilmes fúngicos ainda são escassos.

2.1.6 ÓLEOS ESSENCIAIS

A utilização de plantas medicinais é um hábito antigo da população mundial, sendo para muitas pessoas, a única fonte de prevenção, tratamento e cura de muitas doenças (SILVA, 2011). Atualmente, o uso de produtos naturais vem ganhando destaque no tratamento da saúde humana e animal, pois podem apresentar substâncias bioativas contra parasitos, microrganismos e enfermidades de outra natureza, sem causar prejuízos ao meio ambiente, além de serem menos agressivos à saúde do homem, no que se refere aos resíduos farmacológicos e de agrotóxicos presentes nos alimentos de origem animal e vegetal, respectivamente (VIEIRA et al., 2015).

As plantas apresentam inúmeras substâncias ativas, que as tornam uma fonte particularmente promissora de novas moléculas potencialmente úteis ao homem. Dentre os diversos produtos biologicamente ativos obtidos de vegetais, encontram-se os óleos essenciais, que são originados do metabolismo secundário das plantas e possuem composição química complexa (OLIVEIRA et al., 2011).

De acordo com Bakkali et al. (2008), os óleos essenciais são 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).

Os constituintes dos óleos essenciais são metabólitos secundários principalmente os derivados terpênicos como mono e sesquiterpenos e os fenilpropanoides que conferem suas características organolépticas (NGOH et al., 1998, JIANG et al., 2012). A biossíntese desses metabólitos é realizada por rotas metabólicas específicas do organismo. A relação dessas rotas com a síntese dos metabólitos primários é estreita, uma vez que esta síntese fornece moléculas precursoras para as principais rotas de produção dos compostos secundários (CASTRO et al., 2004). Algumas espécies do gênero *Lippia* têm sido caracterizadas pela presença de óleos essenciais, com atividade antimicrobiana (ALBUQUERQUE et al., 2006).

A atividade biológica dos óleos essenciais e de seus constituintes pode atuar como agentes fungistáticos e/ou fungicida, dependendo das concentrações utilizadas. O mesmo óleo pode ser ativo contra um amplo espectro de espécies de microrganismos, porém as concentrações inibitórias mínimas inibitórias (CIMs) podem variar (ANTUNES; CAVACO, 2010). As propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais devem-se a sua característica lipofítica (BAKKALI et al., 2008). 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).

Atualmente, métodos de controle de doenças que sejam menos agressivos com o ambiente vêm sendo estudados, mostrando-se como uma boa alternativa, o uso de óleos essenciais extraídos de plantas medicinais e aromáticas; estas, por sua vez, apresentam compostos químicos que causam algum tipo de toxicidade direta, ou geram um fortalecimento nas estruturais da planta, incrementado assim sua resistência à penetração dos micélios dos fungos (OLIVEIRA;HOLANDA, 2009).

É necessário destacar que mesmo que os óleos essenciais possuam grande potencial e utilização na agricultura sustentável, eles podem prejudicar o desenvolvimento e a germinação de plantas. Grosso et al. (2010) destacam que os mono e sesquiterpenos podem afetar os processos fisiológicos de plantas. Além de serem caracterizados como metabólitos secundários de plantas e de baixa toxicidade a humanos, os óleos essenciais são amplamente testados no controle *in vitro* e *in vivo* de fitopatógenos e no tratamento de sementes (Médice et al., 2007; PEREIRA et al., 2008; RODRIGUES et al., 2006; SILVA & BASTOS, 2007). A exploração da atividade antimicrobiana

utilizando estes compostos secundários constitui-se em mais uma forma potencial para o controle de doenças em plantas cultivadas (SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN, 2005).

2.1.7 *Lippia gracilis* Schauer L.

O gênero *Lippia*, o segundo maior da família Verbenaceae, que compreende 35 gêneros e 1.035 espécies, sendo muitas exclusivamente brasileiras. Este gênero é constituído de plantas de pequeno porte, entre ervas, arbustos e pequenas árvores (PASCUAL, et al., 2001), e caracteriza-se pelo acúmulo de óleos essenciais em tricomas granulares (MARINHO, et al., 2011). Aproximadamente 200 espécies estão distribuídas ao redor do mundo, principalmente nas Américas Central e do Sul, e na África (AGUIAR e COSTA, 2005). A quantidade e a qualidade dos óleos essenciais que ocorrem nas espécies do gênero *Lippia*, das quais 68 espécies são endêmicas do Brasil, coloca este gênero em destaque entre as Verbenaceas (SALIMENA; MÚLGURA, 2015).

A família inclui aproximadamente 200 espécies de ervas, arbustos e árvores de pequeno porte, distribuídas principalmente na América Central, regiões tropicais da África, América do Norte, América do Sul e Austrália (MUNIR, 1993; PASCUAL et al., 2001; SILVA et al., 2006; GOMES et al., 2011). No Brasil, as plantas do gênero *Lippia* são espécies próprias do bioma Caatinga, que é o principal bioma da região Nordeste, estendendo-se pelo domínio do clima semiárido, sendo comum sua presença nos estados do Piauí, Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco (CAVALCANTI, 2006) e Sergipe (LORENZI; MATOS, 2002).

Lippia gracilis Schauer é uma espécie da família Verbenaceae, originária do Nordeste brasileiro com ampla distribuição na Floresta Tropical Sazonal Seca (BITU et al. 2015; CRUZ et al. 2014). *L. gracilis*, conhecida popularmente como “alecrim-da-chapada” ou “alecrim-de-tabuleiro”, é um arbusto de folha caduca ramificada que pode atingir cerca de 2 metros, além de possuir caule quebradiço, com folhas pequenas e aromáticas de pouco mais de um centímetro de comprimento. As flores são miúdas e amarelo-esbranquiçadas, reunidas em espigas de eixo curto. Os frutos são do tipo aquênio extremamente pequeno, cujas sementes raramente germinam (LORENZI; MATOS, 2002). Alguns autores a sinonimizaram com outras quatro espécies: *L. grata* Schauer, *L. dumetorum* Herzog, *L. laxibracteata* Herzog e *L. hickenii*, no grupo B da *Lippia* Seção

Goniostachium (O'LEARY et al. 2012). A espécie é principalmente propagada por estaquia, devido à dificuldade de germinação das sementes. A planta possui grande resistência à seca e a altas temperaturas, perdendo suas folhas somente após um longo período de estiagem (OLIVEIRA et al., 2008).

L. gracilis apresenta-se como uma espécie medicinal aromática que apresenta importância antimicrobiana e farmacológica, devido às propriedades químicas de seus óleos essenciais, constituídos principalmente dos derivados fenólicos, timol e carvacrol, encontrados nos tricomas presentes nas folhas (SANTOS et al. 2016; BITU et al. 2014). O óleo essencial desta espécie possui forte atividade bactericida, fungicida, leishmanicida, carrapaticida e inseticida devido à presença majoritária dos monoterpenos carvacrol ou timol. A espécie *Lippia gracilis*, em particular, apresenta propriedades antifúngica, antibiótica, anti-inflamatória, anticépticas, antioxidante e antitumoral (ALBUQUERQUE et al., 2006; SILVA et al., 2008; CRUZ et al., 2013; MELO et al., 2013; CRUZ et al., 2013, BITU et al., 2014, HERNADES et al., 2017; TREVISAN et al., 2003).

Em função das propriedades dos óleos essenciais diversas espécies do gênero *Lippia* são utilizadas na medicina popular e apresentam grande potencial farmacológico. Neste aspecto, o uso dessa espécie nativa da Caatinga, pode oferecer produtos com potencial comercial nas indústrias químicas, sobretudo as farmacêuticas a partir da obtenção do óleo. Desse modo nota-se a importância de estudar a ação dos óleos essenciais mediante sua atividade antifúngica, viabilizando não só uma melhoria para as empresas de cultivo, como para o meio ambiente e para o consumidor.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Extração do óleo essencial de *L. gracilis* e obtenção dos componentes majoritários

As folhas da *L. gracilis* foram coletadas no município de Mossoró-RN, aos arredores do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Plantas na Universidade do Estado do Rio Grande do Norte.

O processo de extração foi realizado como descrito anteriormente por Oliveira et al. (2012), com algumas modificações. O óleo essencial foi extraído utilizando o método de hidrodestilação em aparelho de *Clevenger*, utilizando 400 g de biomassa foliar em balão volumétrico de 5 L, contendo 2 L de água destilada. O óleo essencial foi separado do hidrolato através do processo de decantação na bureta, utilizando sulfato de sódio com algodão e éter.

Os componentes majoritários do óleo essencial, os monoterpenos timol e carvacrol, foram obtidos comercialmente da Sigma-Aldrich Brasil Ltda.

3.2. Microrganismos e condições de cultivo

As estirpes fúngicas *F. oxysporum* URM6704 e *F. solani* URM6749, *C. gloesporioides* URM6176, *C. lindemuthianum* URM5771 foram obtidas da coleção de culturas da Coleção de Culturas Micoteca URM da Universidade Federal de Pernambuco

Discos de 9 mm das espécies fúngicas armazenados em água destilada estéril, foram inoculados em placas de petri contendo meio de cultura Batata-Ágar-Dextrose (BDA) incubadas em câmara de germinação BOD (*Biochemical Oxygen Demand*) sob a temperatura de 25 °C por 10 dias.

3.3. Atividade antifúngica do óleo essencial de *L. gracilis*

3.3.1. Atividade do óleo de *L. gracilis* sobre o crescimento micelial

O efeito do óleo essencial sobre o crescimento micelial, foi realizado utilizando metodologia descrita por Wang e Liang (2014), com adaptações. Discos (9mm) de cada espécie foram inoculados em placas contendo o meio BDA com diferentes concentrações de óleo essencial (1 a 0,0078%); ou apenas em meio BDA (controle negativo). As placas

foram incubadas em uma câmara de germinação a 25°C, e mensurado o diâmetro dos micélios na presença e ausência do óleo nos tempos 3, 5, 7 e 10 dias. Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados foram apresentados em termos da média do diâmetro dos micélios e porcentagem de inibição (PIC), por meio da fórmula:

$$\left(\text{PIC} = \frac{\text{diâmetro da testemunha} - \text{diâmetro do tratamento}}{\text{diâmetro da testemunha}} \cdot 100 \right)$$

3.3.2. Atividade do óleo de *L. gracilis* sobre o crescimento vegetativo

A avaliação da atividade do óleo essencial da *L. gracilis* sobre o crescimento vegetativo dos fungos foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Mota et al. (2019), com adaptações. Os fungos foram cultivados em meio BDA durante 10 dias, após este período, os esporos foram retirados e suspensos em meio BD (Batata-Dextrose). Utilizando câmara de Neubauer a concentração final de esporos foi padronizada a 10⁵ esporos/mL. Foram utilizadas placas de 96 poços de poliestireno de fundo chato, onde cada poço teve 100 µL de caldo BD contendo os esporos (10⁵ esporos/mL), e 100 µL do óleo essencial em diferentes concentrações (1 a 0,0078%). Os resultados do crescimento fúngico foram observados através da mensuração da densidade óptica a um comprimento de onda de 620 nm utilizando leitor de microplacas, nos tempos 0, 24, 48 e 72 horas.

3.4. Atividade do óleo de *L. gracilis* sobre a formação de biofilmes

Os biofilmes foram avaliados através da quantificação da biomassa total dos biofilmes por coloração com cristal de violeta e análise da atividade metabólica utilizando sal 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio (MTS).

Para a quantificação de biomassa, foi utilizada metodologia descrita por Simões, Simões e Lima (2015), com algumas modificações. Após o crescimento dos fungos por 72 horas em placas de microtitulação de 96 poços, a formação de biofilmes foi avaliada através da quantificação da biomassa total. O meio de cultura foi removido de cada poço e os fungos aderidos a placa foram lavados por 2 vezes com água destilada estéril, em seguida, foram adicionados 200 µL de metanol 99%, deixando-o por 15 minutos. O metanol foi retirado e as placas foram secas a 25° C, após este processo, foram adicionados 200 µL de cristal de violeta a 1%, permanecendo por 5 minutos.

Posteriormente, para remoção, os poços foram lavados 3 vezes com água destilada estéril, após isso, foi adicionado em cada poço 200 µL de ácido acético a 33%, aguardando 1 minuto para solubilização, o cristal de violeta diluído em ácido acético foi mensurado a comprimento de onda de 590 nm utilizando leitor de microplacas.

Visando a determinação o efeito do óleo essencial sobre a atividade metabólica fúngica, foi utilizada metodologia citada por Galletti et al. (2017), com algumas modificações. Após a formação do biofilme em placas de 96 poços, as placas foram lavadas duas vezes e posteriormente, foram adicionados 100 µL de PBS (phosphate buffered saline) e 20 µL de uma solução do sal tetrazólio *CellTiter 96® Aqueous MTS Reagent Powder* (Promega, WI, USA) de acordo com recomendações do fabricante. Após este processo, as placas de 96 poços foram incubadas na câmara de germinação a 37°C na ausência de luz por 3 horas. O conteúdo dos poços foi então mensurado a um comprimento de onda de 490 nm utilizando leitor de microplacas.

3.5. Atividade antifúngica e antibiofilmes dos monoterpenos timol e carvacrol

A avaliação da atividade do timol e carvacrol da *L. gracilis* sobre o crescimento vegetativo dos fungos e sobre os biofilmes fúngicos foram realizados como descrito nos itens 3.3 e 3.4. Porém, os monoterpenos forma utilizados em concentrações que varivam de 1 a 0,0078 mg/mL diluídos em meio BD contendo 4% de DMSO.

3.6. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A análise foi realizada seguindo metodologia descrita por Vale et al. (2019), com adaptações. Os biofilmes de *F. oxysporum* e *C. gloesporioides* foram desenvolvidos em placas de 24 poços na ausência (controle negativo) e presença do óleo essencial da *L. gracilis* a 0,0625 %. Após a formação dos biofilmes, com 72 horas, foram realizadas 2 lavagens com água estéril, no intuito de remover as células facilmente aderidas e em seguida, após a secagem, os poços foram desidratados usando etanol a 70% e 90% por 10 minutos e 100% por 20 minutos, aguardando a secagem do material a temperatura ambiente. Para a observação, as células foram revestidas de ouro e as eletromicrografias foram obtidas através do microscópio eletrônico de varredura Quanta 450 FEG, FEI (Waltham, MA, USA).

3.7. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o programa GraphPadPrism® versão 6.01. Todos os dados obtidos nos ensaios foram comparados utilizando ANOVA, com o teste Bonferroni, onde $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

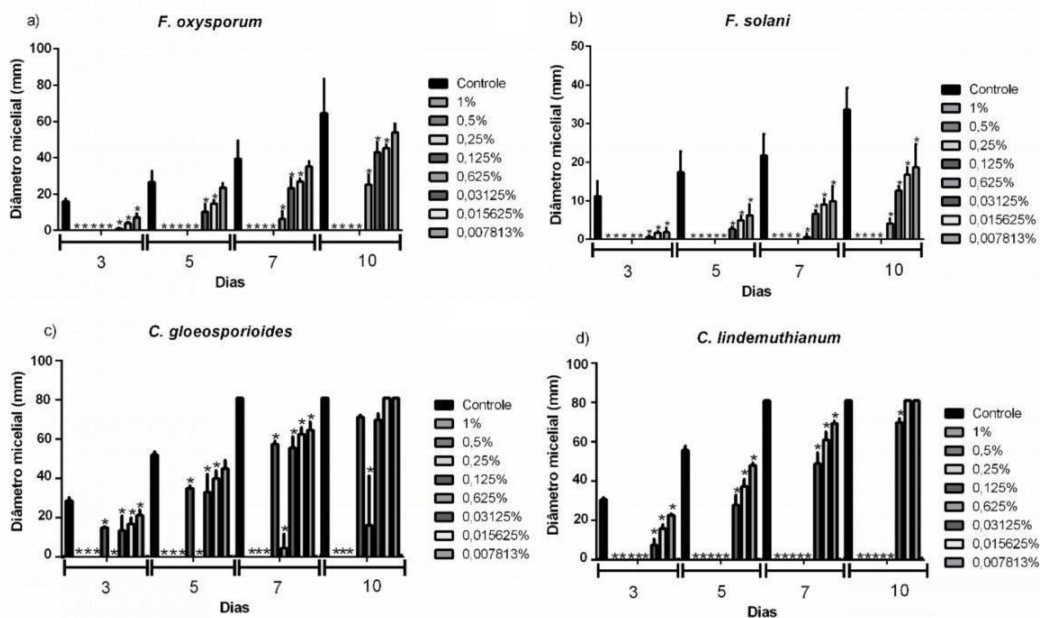
4. RESULTADOS

4.1. Atividade antifúngica do óleo essencial sobre o crescimento micelial

Os resultados referentes a atividade antifúngica do óleo essencial de *L. gracilis* sobre o crescimento micelial de *F. oxysporum*, *F. solani*, *C. gloesporioides* e *C. lindemuthianum* estão apresentados na forma de médias do diâmetro dos micélios, e porcentagem de inibição de crescimento micelial na presença do óleo essencial (Figura 1 e 2). Em termos gerais, o óleo essencial apresentou clara atividade antifúngica apresentando diferenças significativas entre o controle e a maioria dos tratamentos, em geral, apresentando curva dose-resposta (Figura 1 e 2).

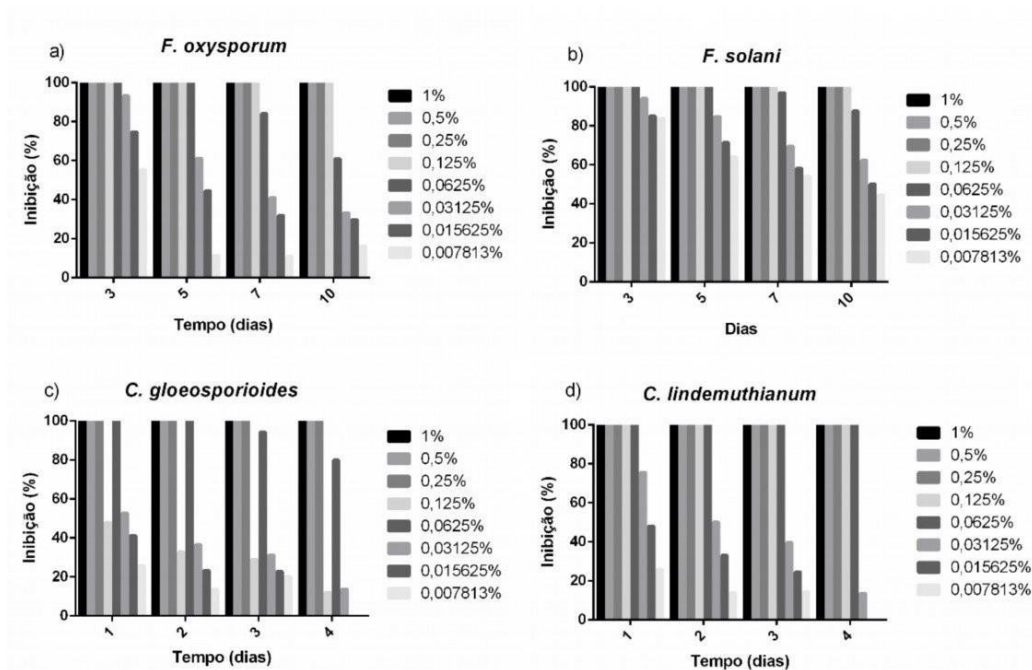
O óleo essencial de *L. gracilis* reduziu de maneira significativa o crescimento micelial de *F. oxysporum* e *F. solani* (Figura 1a e 1b) em todas as concentrações testadas, com exceção da menor concentração (0,007813 %). No que diz respeito ao crescimento micelial de *C. gloesporioides* (Figura 1c) na presença do óleo essencial, as maiores concentrações utilizadas do óleo inibiram completamente o crescimento do micélio, porém a atividade do óleo apresentou variações na sua atividade no decorrer dos dias do experimento. Em relação a atividade do óleo sobre *C. lindemuthianum* (Figura 1d), mostra-se claramente que no tratamento utilizando as concentrações de 1 a 0,625%, não houve qualquer crescimento micelial quando comparados ao grupo controle.

Figura. 1. Crescimento micelial de *F. oxysporum* (a), *F. solani* (b), *C. gloeosporioides* (c) e *C. lindemuthianum*(d). na presença de diferentes concentrações do óleo essencial da *L. gracilis*. “*” $p < 0,05$ demonstra diferença significativa em relação ao controle.



Corroborando com os dados obtidos na figura 1, os dados de porcentagem de inibição de crescimento (PIC) na presença do óleo essencial de *L. gracilis* demonstram que o óleo inibiu completamente o crescimento micelial de todos os fungos fitopatogênicos variando a concentração de 0,125 a 1 % (Figura 2). Além disso, o fungo *C. lindemuthianum* mostrou-se mais susceptível a ação do óleo essencial em comparação com os demais.

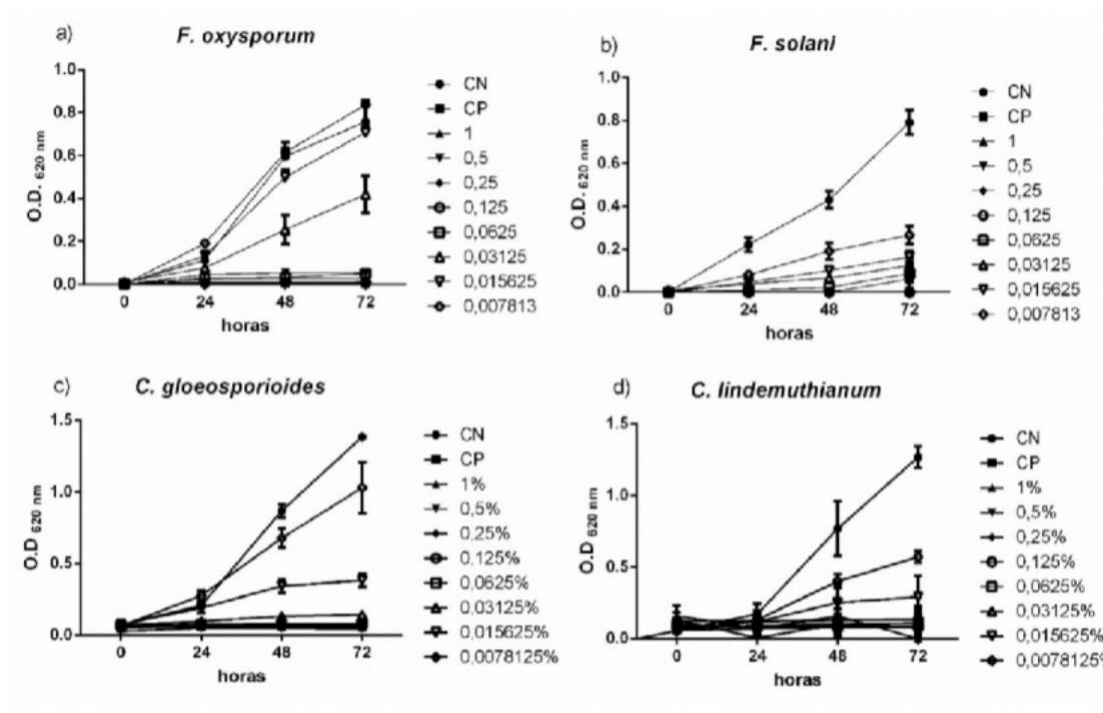
Figura 2. Porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) de *F. oxysporum* (a), *F. solani* (b), *C. gloeosporioides* (c) e *C. lindemuthianum* (d) na presença de diferentes concentrações do óleo essencial da *L. gracilis*.



4.2. Atividade do óleo essencial de *L. gracilis* sobre o crescimento vegetativo dos fungos fitopatogênicos

Os resultados da atividade do óleo essencial de *L. gracilis* sobre o crescimento vegetativo dos fungos fitopatogênicos são mostrados na figura 3. Os resultados mostram que o crescimento de *F. oxysporum* teve seu crescimento reduzido na presença do óleo em concentrações que variavam entre 1 a 0,0312 %. Nas figuras 3b e 3d, observa-se que o óleo essencial apresentou atividade antifúngica significativa sobre o crescimento de *F. solani* e *C. lindemuthianum* em todas as concentrações testadas quando comparada ao controle negativo. Em relação a atividade do óleo sobre o crescimento de *C. gloeosporioides* (Figura 3c), o óleo essencial de *L. gracilis* apresentou redução do crescimento do fungo até a concentração de 0,015%.

Figura 3. Crescimento vegetativo de *F. oxysporum* (a), *F. solani* (b), *C. gloeosporioides* (c) e *C. lindemuthianum* (d) na presença de diferentes concentrações de óleo essencial de *L. gracilis*. CN – Controle negativo (BD); CP – Controle positivo (100 mM de peróxido de hidrogênio).

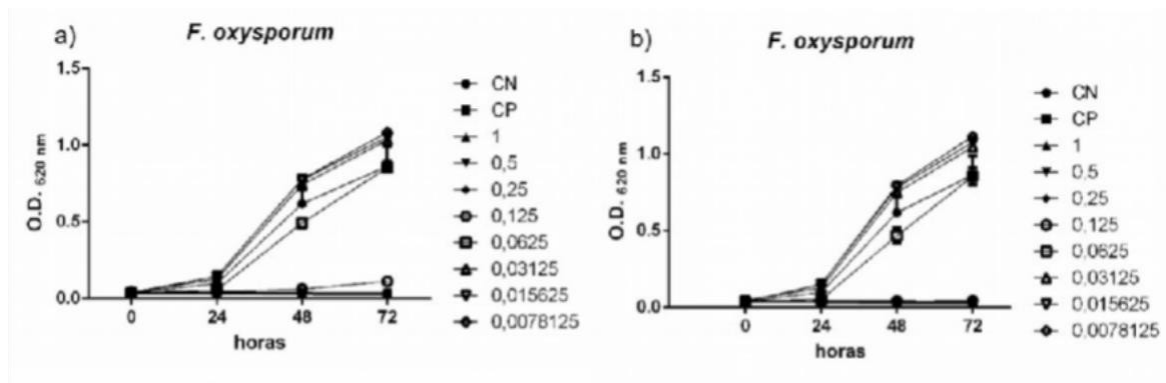


4.3. Atividade do carvacrol e timol sobre o crescimento vegetativo de *F. oxysporum*

Uma vez comprovada a atividade antifúngica do óleo essencial de *L. gracilis* sobre os fungos fitopatogênicos do gênero *Fusarium* e *Colletotrichum*, a atividade dos seus componentes majoritários presentes no óleo, carvacrol e timol, foram testados sobre

F. oxysporum. Os resultados mostram a atividade antifúngica significativa dos monoterpenos carvacrol (Figura 4a) e timol (Figura 4b) nas concentrações de 1 a 0,125 mg/mL sob o fungo *F. oxysporum*, mostrando claramente a efetividade antifúngica dos componentes majoritários do óleo essencial.

Figura. 4. Crescimento vegetativo de *F. oxysporum* na presença de diferentes concentrações de carvacrol (a) e timol (b). CN – Controle negativo (BD); CP – Controle positivo (100 mM de peróxido de hidrogênio).

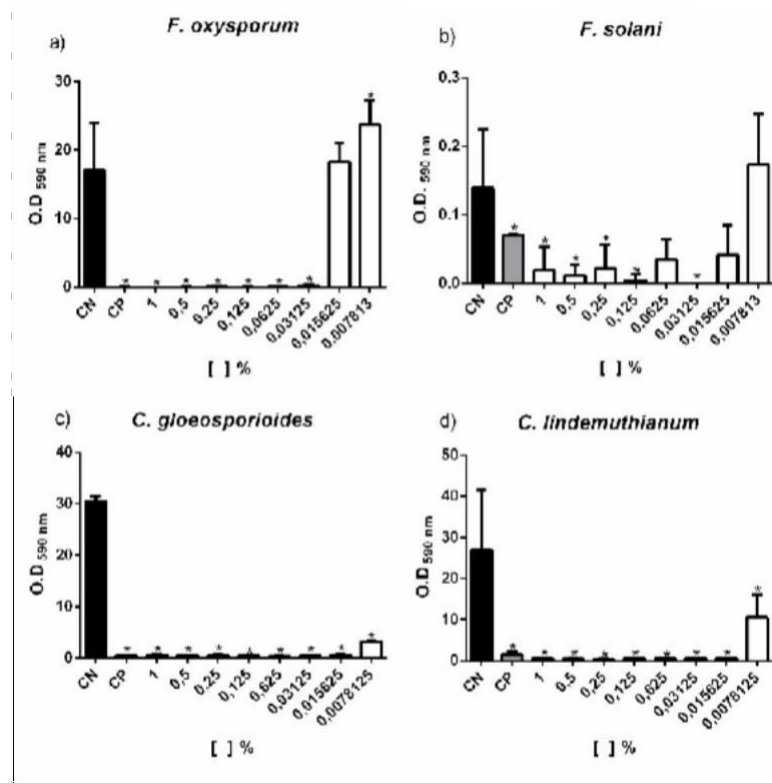


4.4. Atividade do óleo essencial de *L. gracilis* sobre a formação de biofilmes fúngicos

A capacidade do óleo essencial de *L. gracilis* em inibir a formação de biofilmes fúngicos foi avaliada através da quantificação da biomassa total dos biofilmes e atividade metabólica dos fungos presentes nos biofilmes.

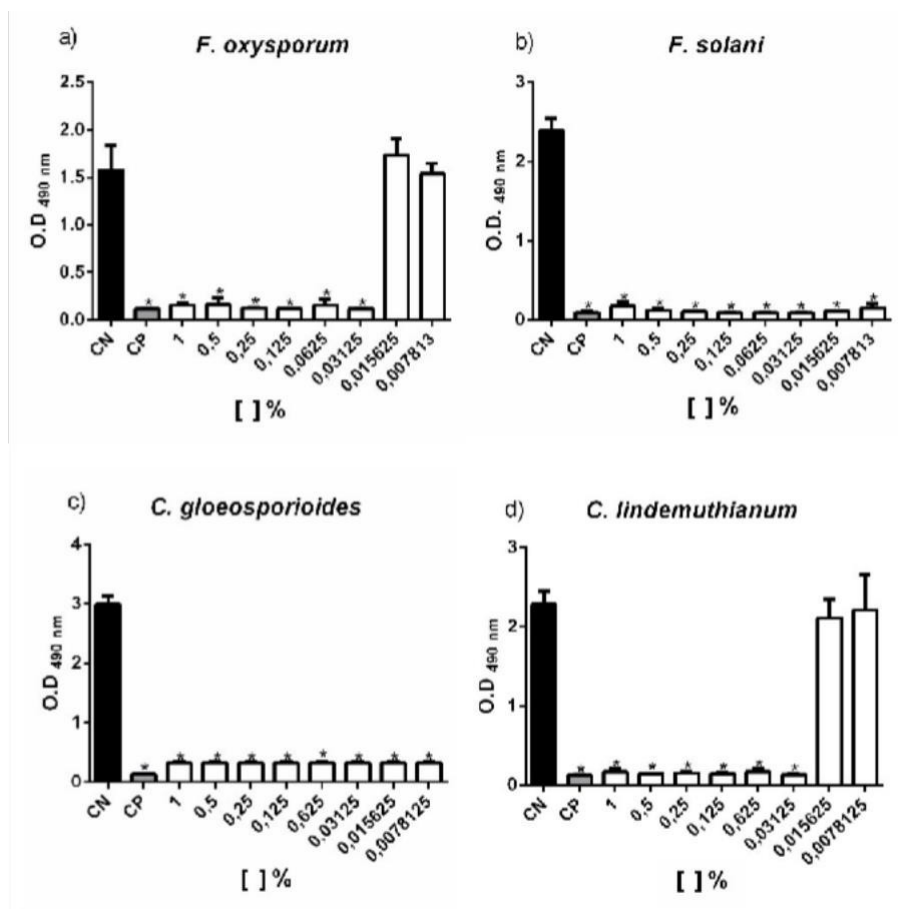
Em relação a quantificação da biomassa dos biofilmes fúngicos, a formação de biomassa do biofilme de *F. oxysporum* (Figura 5a) foi inibida completamente nas concentrações de 1 a 0,03125%, interessante, na menor concentração testada (0,007813%) obteve valor maior que o controle negativo, provavelmente causado por estresse microbiano ocasionado pela presença do óleo essencial. Por outro lado, o biofilme de *F. solani* (Figura 5b) apresentou nas maiores concentrações redução da biomassa, diferindo significativamente nas concentrações de 1 a 0,125% e 0,03125%. A formação de biomassa dos biofilmes de *C. gloeoporioides* (Figura 5c) e de *C. lindemuthianum* (Figura 5d), foi inibida completamente em todas as concentrações testadas.

Figura 5. Efeito do óleo essencial de *L. gracilis* na formação de biomassa do biofilme de *F. oxysporum* (a), *F. solani* (b), *C. gloeosporioides* (c) e *C. lindemuthianum* (d). CN – Controle negativo (BD); CP – Controle positivo (100 mM de peróxido de hidrogênio). “**” $p < 0,05$ demonstra diferença significativa em relação ao controle.



A figura 6 mostra a atividade do óleo essencial sob a atividade metabólica dos biofilmes de *F. oxysporum*, *F. solani*, *C. gloeosporioides* e *C. lindemuthianum*. Em relação a atividade metabólica dos biofilmes de *F. oxysporum* e *C. lindemuthianum* (Figura 6a e 6d), o óleo essencial apresentou redução significativa nas concentrações que variaram de 1 a 0,03125 %. Além disso, o óleo essencial foi capaz de reduzir a atividade metabólica de *F. solani* (Figura 6b) e *C. gloeosporioides* (Figura 6c) com valores próximos a zero, apresentando diferença significativa em todas as concentrações testadas em relação ao controle.

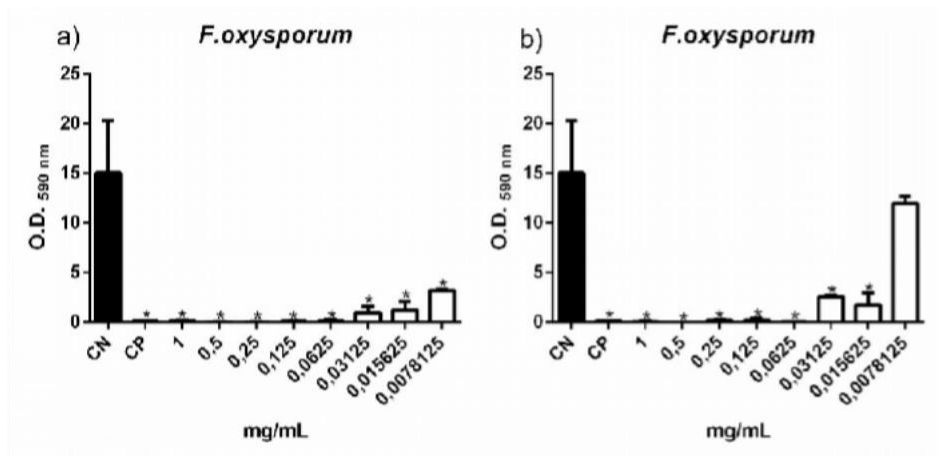
Figura. 6. Efeito do óleo essencial de *L. gracilis* sobre a atividade metabólica dos biofilmes de *F. oxysporum* (a), *F. solani* (b), *C. gloeosporioides* (c) e *C. lindemuthianum* (d). CN – Controle negativo (BD); CP – Controle positivo (100 mM de peróxido de hidrogênio). “*” $p < 0,05$ demonstra diferença significativa em relação ao controle.



4.5. Atividade de cavacrol e timol sob a formação de biofilme de *F. oxysporum*

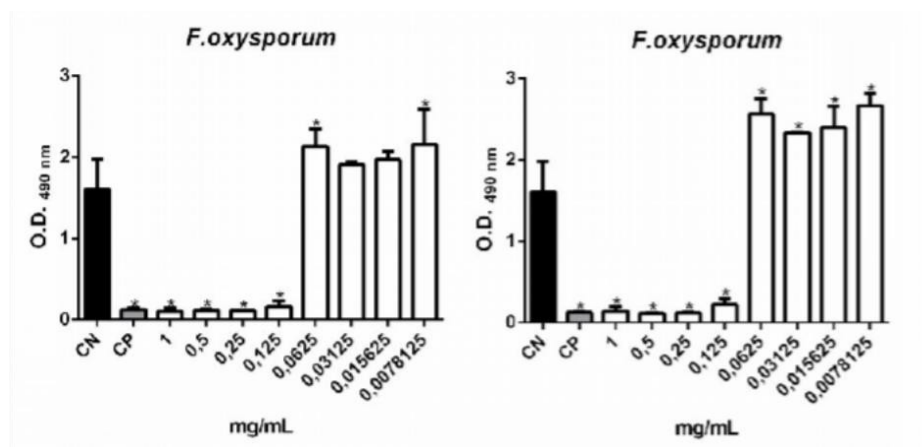
A quantificação da biomassa do biofilme de *F. oxysporum* na presença de cavacrol (Figura 7a) mostrou uma redução significativa na formação de biomassa do biofilme em todas as concentrações testadas. Em relação a quantificação de biomassa dos biofilmes de *F. oxysporum* (Figura 7b) na presença de timol, o composto apresentou redução significativa nas concentrações de 1 a 0,0625 mg/mL, onde foi observado uma completa redução da formação do biofilme.

Figura 7. Efeito dos monoterpenos carvacrol (a) e timol (b) sobre a formação de biomassa do biofilme de *F. oxysporum*. CN – Controle negativo (BD); CP – Controle positivo (100 mM de peróxido de hidrogênio). “*” $p < 0,05$ demonstra diferença significativa em relação ao controle.



Em relação a ação do carvacrol e timol sobre a atividade metabólica do biofilme de *F. oxysporum*, pode-se observar que os componentes majoritários do óleo essencial de *L. gracilis* apresentam uma redução significativa em na atividade metabólica do fungo em concentrações que variam de 1 a 0,125 mg/mL. Interessantemente, as menores concentrações apresentaram valores superiores ao grupo controle.

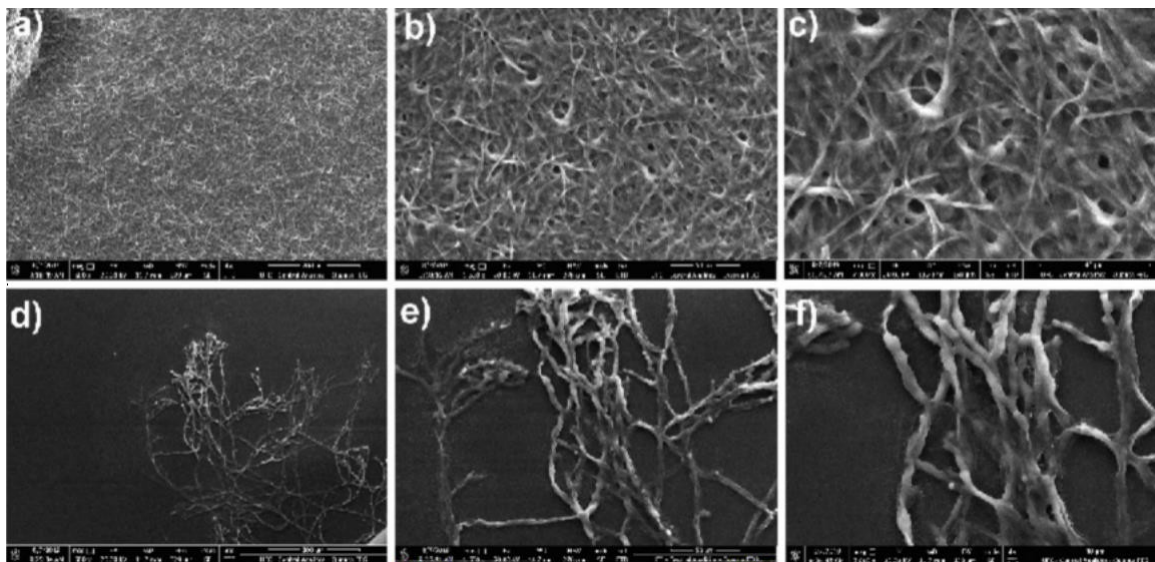
Figura 8. Efeito do carvacrol (a) e timol (b) sobre a atividade metabólica do biofilme de *F. oxysporum*. CN – Controle negativo (BD); CP – Controle positivo (100 mM de peróxido de hidrogênio). “*” $p < 0,05$ demonstra diferença significativa em relação ao controle.



4.6. Microscopia Eletrônica de Varredura dos biofilmes fúngicos tratados com óleo essencial de *L. gracilis*

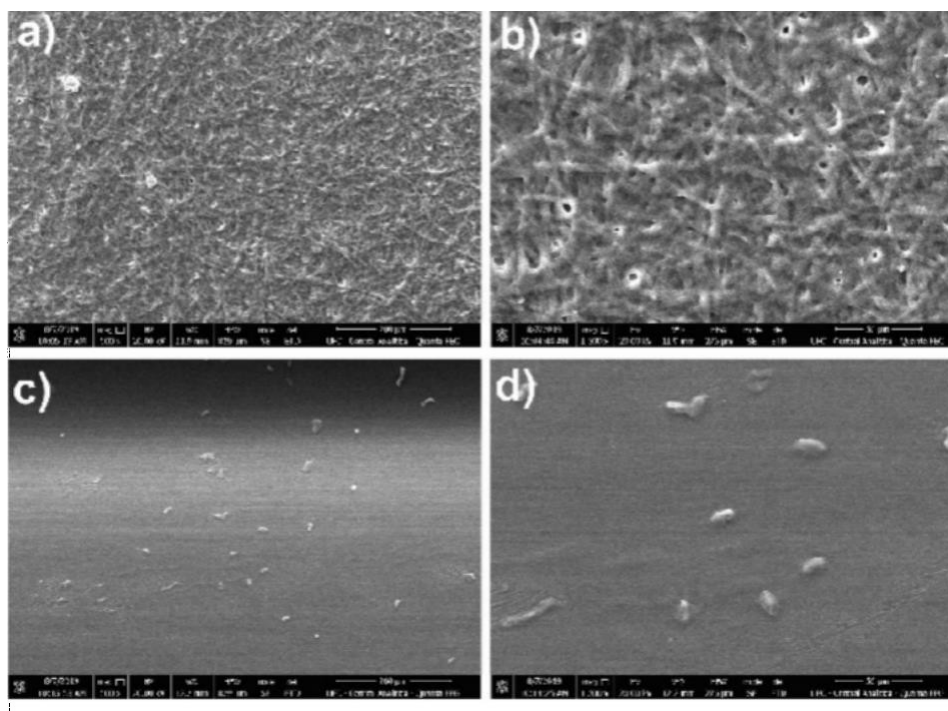
A figura 9 são apresentadas eletromicrografias do biofilme de *F. oxysporum* obtidas através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). O controle negativo, observa-se o biofilme de *F. oxysporum* na ausência do óleo essencial (Figura 9a -c), que mostra uma alta densidade de hifas e matriz extracelular. Por outro lado, o biofilme desenvolvido na presença de 0,0625 % do óleo essencial da *L. gracilis* (Figura 9d -f), é possível observar uma clara redução na concentração de hifas, matriz extracelular e alterações morfológicas na superfície dos fungos.

Figura. 9. Eletromicrografias do biofilme de *F. oxysporum* obtidos através de microscopia eletrônica de varredura. Biofilme de *F. oxysporum* desenvolvido em meio Batata Dextrose (a - c) e desenvolvido na presença do óleo essencial de *L. gracilis* a 0,0625% (d -f). Magnificações de 300, 1500 e 3000 x.



A figura 10 mostra as eletromicrografias do biofilme de *C. gloesporioides* na presença e ausência de óleo essencial. No grupo controle (Figura 10a - b) é possível observar um biofilme denso, com presença de hifas e matriz extracelular. Por outro lado, o fungo na presença de 0,0625 % do óleo essencial é observar apenas a presença de esporos, sugerindo que o óleo essencial foi capaz de inibir a germinação dos esporos, impedindo que haja a formação de biofilmes (Figura 10c - d). Além disso, é possível observar alterações morfológicas nos esporos de *C. gloesporioides* tratados com o óleo essencial.

Figura 10. Eletromicrografias do biofilme de *C. gloesporioides* obtidos através de Microscopia Eletrônica de Varredura. Biofilme de *C. gloesporioides* desenvolvido em meio Batata Dextrose (a e b); e desenvolvido na presença de 0,015 % do óleo essencial de *L. gracilis* (c e d). Magnificações de 300 e 1500x.



5. DISCUSSÃO

A atividade antifúngica e antibiofilme do óleo essencial de *L. gracilis* Schauer sobre os fungos fitopatogênicos dos gêneros *Fusarium* e *Colletotrichum*, obtidas neste trabalho corroboram com resultados observados por Albuquerque et al. (2006), Lima et al. (2010), Harding et al. (2009), Galletti et al. (2017), Tamura et al. (2015) Manganyi, Regnier e Olivier (2015) e Santos (2014).

Carnelossi et al. (2009) avaliando o efeito *in vitro* de óleos essenciais de capim-limão (*Cymbopogon citratus*), eucalipto (*Eucalyptus citriodora*) e menta (*Mentha arvensis*) sobre o fungo *C. gloesporioides*, observaram total inibição do crescimento micelial do fitopatógeno. Combrinck et al. (2011) observaram inibição do crescimento dos fitopatógenos *C. gloesporioides*, *Penicillium digitatum* e *Alternaria citrii* pelo óleo essencial de capim-limão. O crescimento micelial dos fitopatógenos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* e *Alternaria alternata*, que causam a deterioração do tomate cereja, foi consideravelmente reduzido quando aplicado diferentes concentrações do óleo essencial de endro (*Anethum graveolens* L.) (Tian et al., 2011). Sharma e Tripathi (2008), usando óleo de laranja (*Citrus sinensis*) sobre *A. niger*,

observaram que óleo reduziu tanto o desenvolvimento do fungo como a germinação de esporos.

Souza-Júnior et al. (2009), obtiveram uma inibição completa do crescimento de *C. gloeosporioides* isolado do maracujazeiro amarelo utilizando óleo essencial de *Lippia sidoides*. Albuquerque et al. (2006) observou que o óleo essencial da *L. gracilis* Schauer demonstrou potencial inibitório contra os fungos *Geotrichum candidum*, *Trichoderma viride*, *Torula herbarum*, *Paecilomyces sp*, *Aspergillus nidulans*, *Fusicoccum sp*, *Aspergillus flavus* e *Paecilomyces aeruginen*, inibindo 100 % do crescimento fúngico a uma concentração de 420 µL/L. Mota et al. (2002), obteve completa inibição do desenvolvimento de *Lasioidiploidia theobromae* na presença do óleo essencial de *L. sidoides*.

De acordo com Tzortzakis e Economakis (2007), os compostos voláteis produzidos pelos óleos essenciais podem apresentar alterações nos componentes da parede celular dos fungos, desencadeando um efeito deletério que interfere na percepção e transdução de sinais envolvidos na mudança de fase de desenvolvimento do fungo (de vegetativa para reprodutiva). Por isso, vários óleos essenciais também causam impacto no processo de esporulação do fungo.

No trabalho realizado por Lima et al. (2010), o óleo essencial extraído das folhas de *L. gracilis* apresentou inibição completa da germinação do fungo *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, utilizando 2500 ppm, demonstrando maior efeito fungistático em relação ao óleo essencial obtido das folhas de *kenaf* (*Hibiscus cannabinus*), citronela (*Cymbopogon nardus*), eucalipto (*Eucalyptus citriodora*) e frutos de acerola (*Malpighia glabra*). Além disso, resultados obtidos por Oliveira et al. (2008), demonstraram efeito inibitório do óleo de *L. gracilis* (126 µL/mL) e *L. sidoides* (0,3 µL/mL) sobre o crescimento dos fungos *Aspergillus niger*, *Penicillium sp*, *Fusarium sp* e *F. oxysporum*.

Manganyi, Regnier e Olivier (2015), observaram em seus resultados a inibição da formação de biofilmes dos fungos do gênero *Fusarium* sob lentes de contatos gelatinosas, utilizando 50 µL de óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*) e cravo (*Syzygium aromaticum*). Resultados semelhantes foram observados por Pereira et al. (2006) e Hillen et al. (2012) em relação ao óleo essencial de Alecrim na inibição do crescimento de *Aspergillus ochraceus*, e redução do crescimento micelial de *Fusarium sp.* e *Aspergillus flavus*. A eficiência de óleos essenciais do gênero *Lippia* no controle de *F. oxysporum* também foi avaliada por Cueto-Wong et al. (2010), ao utilizarem a espécie

Lippia berlandieri os autores demonstraram que a completa inibição do crescimento micelial de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* foi obtido a uma concentração mínima de 0,2 $\mu\text{L/mL}$.

O efeito antifúngico e antibiofilme do óleo essencial de *L. gracilis* provavelmente está relacionado aos principais componentes encontrados no se óleo essencial, os monoterpenos fenólicos, timol e carvacrol. De fato, o presente trabalho mostrou o potencial antifúngico e antibiofilme significativo destes monoterpenos sobre *F. oxysporum*. Estudos demonstram variações quantitativas na composição química do óleo de *L. gracilis*, que possivelmente estão associadas à diferença genética entre populações de *Lippia*, ao estágio de desenvolvimento, e a idade da planta, a parte da planta a qual o óleo foi extraído e também a fatores ambientais, como características de solo e localização geográfica (BLANK, 2013). Nas análises realizadas, obtivemos resultados positivos quanto a atividade antifúngica desses compostos sobre o *F. oxysporum*.

Estudos realizados por Santos (2014), demonstraram que no óleo essencial da *L. gracilis* o timol apresenta uma concentração de 4,9% a 10,3%, e o carvacrol, uma concentração de 73,9% a 77%. Em estudos realizados por Burt (2007), comprovou-se a existência de uma interação entre o carvacrol e o timol, resultando em uma ação sinérgica entre os compostos, potencializando a ação de ambos frente ao controle das células bacterianas. Neste aspecto, existe algumas possibilidades de mecanismos de ação dos óleos essenciais para a inibição/morte celular de fungos, que podem estar relacionadas com os constituintes do óleo nas reações enzimáticas de síntese da parede celular e permeabilidade da membrana, tais como: inibição da esporulação, alterações morfológicas, redução do diâmetro e espessura da parede celular das hifas. Este mecanismo de ação pode desencadear acumulação intracelular de níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS), resultando em estresse oxidativo (BENTO et al., 2014). De acordo com Juven et al. (1994), a atividade antifúngica do carvacrol sobre os fungos está associado na sua capacidade em causar danos a membranas através de interações entre hidroxilas presentes no composto com grupos amina e hidroxilamina de proteínas nas membranas, alterando a permeabilidade e conseqüentemente, podendo causar lise celular e liberação de conteúdo intracelular. O carvacrol tem como mecanismo de ação a capacidade de desintegrar a membrana externa, permitindo a saída de lipopolisacarídeos e aumento da permeabilidade seletiva, tendo como conseqüência desta, a inibição das ATPases, depleção de ATP e diminuição da força motriz dos prótons (LAMBERT et al.,

2001; BURT et al., 2007). Em relação ao timol, o composto apresenta atividade semelhante a obtida com o carvacrol, e provavelmente mesmo mecanismo de ação, uma vez que sua estrutura química difere do carvacrol pela modificação da posição de um grupamento hidroxila (HELANDER et al., 1998).

6. CONCLUSÃO

Em conclusão, este trabalho mostrou o potencial do óleo essencial extraído de folhas de *L. gracilis* como composto antifúngico e capaz de inibir a formação de biofilme dos fungos do gênero *Fusarium* e *Colletotrichum*. Os resultados obtidos ainda sugerem que as atividades apresentadas pelo óleo essencial estão diretamente associadas a presença dos monoterpenos carvacrol e timol na sua constituição, tal fato permite concluir que o óleo essencial poderá servir como alternativa aos métodos tradicionais utilizados no combate contra doenças causadas por fungos fitopatogênicos dos gêneros *Fusarium* e *Colletotrichum*. Além disso, o trabalho em questão trata-se da primeira descrição de atividade de óleo essencial da *L. gracilis* sobre biofilmes de fungos fitopatogênicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, J. S.; COSTA, M. C. C. D. *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown (Verbenaceae): Levantamento de publicações nas áreas química, agrônômica e farmacológica, no período de 1979 a 2004. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Pernambuco**, v. 8, p. 79–84, 2005.
- AGRIOS, GN **Plantpathology**. Burlington, MA: Elsevier Academic, 2005. 922p.
- ALBUQUERQUE, C. C. et al. Antimicrobial action of the essential oil of *Lippia gracilis* Schauer. **Braz. Arch. Biol. Techn.** v. 49, n. 4, p. 527, 2006.
- ALBUQUERQUE, C.C.; CAMARA, T.R.; MARIANO, R.L.R.; WILLADINO, L.; JÚNIOR, C.M.; ULISSES, C. Antimicrobial action of the essential oil of *Lippia gracilis* Schauer. **Archives of Biology and Technology**, v.49, p.527-535, 2007.
- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory mycology**. 4. ed. New York: John Wiley & Sons, 1996.
- ANTUNES, M.D.C.; Cavacob, A.; The use of essential oils for postharvest decay control. A review. **Flavour Fragrance Journal**. v.25, p.351-366, 2010.
- BLANK, A.F. Transformação de recursos genéticos de plantas aromáticas nativas em riqueza: o potencial do alecrim-de-tabuleiro (*Lippia gracilis*). **Horticultura Brasileira**, v.31, p.512- 512, 2013.
- BAILEY JA, O'Connell RJ, Pring RJ, Nash C. (1992). Infection strategies of *Colletotrichum* species. In *Colletotrichum. Biology, Pathology and Control* (Bailey JA, Jeger MJ, editors. , eds). CABI, Wallingford, UK: 88–120.
- BARBOZA, E.A.; CABRAL, C.S.; GONÇALVES, A.M.; REIS, A.; FONSECA, M.E.N.; BOITEUX, L.S. Identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 infecting tomatoes in Northeast Brazil. **Plant Disease**, v.97, p.422-423, 2013. DOI: 10.1094/PDIS-08-12-0779-PDN.
- BENATO, E.A. Controle de doenças pós-colheita em frutas tropicais. **Summa Phytopathologica, Piracicaba**, v.25, n.1, p.90-93, 1999.
- BOOTH, R.H. & BURDEN, O.J. Pérdidas de postcosacha. In: The Commonwealth Mycological Institute (Eds.) **Manual para patólogos vegetales**. Kew. CAB/FAO. 1986. pp.162-179.
- BAILEY, J.A.; O'CONNELL, R.J.; PRING, R.J.; NASH, C. Infection strategies of *Colletotrichum* species. In: BAILEY, A. J.; JEGER, J. M. *Colletotrichum: biology, pathology and control*. **Oxford: British Society for Plant Pathology**, 1992. p.88-120.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oil: a review. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, n.2, p.446-75, 2008.
- BENTO, C. S., SUDRÉ, C. P., RODRIGUES, R., RIVA, E. M., PEREIRA, M. G. (2014) Descritores qualitativos e multicategóricos na estimativa da variabilidade fenotípica entre acessos de pimentas. **Scientia Agraria**, 8:149-156.
- BITU, V.C.N. et al. Chemical composition of the essential oil of *Lippia gracilis* Schauer leaves and its potential as modulator of bacterial resistance. **Natural Product Research**, v. 28, n. 6, p. 399-402, 2014.
- BITU, V. C. N.; COSTA, J. G. M.; ROGRIGUES, F. F. G.; COLARES, A. V., COUTINHO, H. D. M.; BOTELHO, M. A.; PORTELA, A. C.; SANTANA, N. M. MENEZES, I. R. A. Effect of

Collection Time on Composition of Essential Oil of *Lippia gracilis Schauer* (Verbenaceae) Growing in Northeast Brazil. **TEOP**, v. 18, n. 3, p. 647-653, 2015.

BITU, V., BOTELHO, M.A., COSTA, J.G., RODRIGUES, F.F., VERAS, H.N., MARTINS, K.T. & SIQUEIRA, J.D.S. 2014. Phytochemical screening and antimicrobial activity of essential oil from *Lippia gracillis*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, pp. 69-75.

BURT S 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. **Int J Food Microbiol** 942: 223-253.

CARVALHO F.K.L., MEDEIROS R.M.T., ARAUJO J.A.S. & RIET-CORREA F. 2011. Intoxicação experimental por *Passiflora foetida* (Passifloraceae) em caprinos. **Pesq. Vet. Bras.** 31:6:477-481.

CAVALCANTI, S.C.H.; NICULAU, E.S.; BLANK, A.F.; CÂMARA, C.A.G.; ARAÚJO, I.N.; ALVES, P.B. Composition and acaricidal activity of *Lippia sidoides* essential oil against two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch). **Bioresource Technology**, v.101, p.829– 832, 2010.

CARVALHO, J.B. et al. Fungitoxicidade de *Cymbopogon citratus* e *Cymbopogon martinii* a *Colletotrichum gloeosporioides* em frutos de pimentão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.10, n.1, p.88-93, 2008.

CARNELOSSI, P.R. et al. Óleos essenciais no controle pós-colheita de *Colletotrichum gloeosporioides* em mamão. **Rev. bras. plantas med.** [online]. 2009, vol.11, n.4, pp.399-406.

CASTRO, H.G.; OLIVEIRA, L.O.; BARBOSA, L.C.A.; FERREIRA, F.A.; DA SILVA, D.J.H.; MOSQUIM, P.R.; NASCIMENTO, E.A. Teor e composição do óleo essencial de cinco acessos de mentrasto. **Química Nova**, v.27, 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 Agronômica*, v. 41, n. 2 p. 308-314, 2010. CARVALHO, J.B. et al. Fungitoxicidade de *Cymbopogon citratus* e *Cymbopogon martinii* a *Colletotrichum gloeosporioides* em frutos de pimentão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.10, n.1, p.88-93, 2008.

CASTRO, H.G. et al. Crescimento, teor e composição do óleo essencial de *Cymbopogon nardus* (L.). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v.09, n.04, p.55-61, 2007.

CELOTO, M.I.B.; PAPA, M.F.S.; SACRAMENTO, L.V.S.; CELOTO, F.J. Atividade antifúngica de extratos de plantas a *Colletotrichum gloeosporioides*. **Acta Scientiarum**. v.30, n.1, p.1-5, 2008.

CHITARRA, M.I.F. & CHITARRA, A.B. Pós-colheita de frutos e hortaliças – fisiologia e manuseio. **Lavras. ESAL/FAEPE**. 1990.

COOPER, J.; DOBSON, H. The benefitsofpesticidestomankindandtheenvironment. **CropProtection**, v. 26, p. 1337-1348, 2007.

COMBRINCK, S.; REGNIER, T.; KAMATOU, G.P.P. In vitro activity of eighteen essential oils and some major components against common postharvest fungal pathogens of fruit. **Industrial Crops and Products, Fargo, DN**, v. 33, p. 344-349, 2011.

COSTA, R. V.; CASELA, C. R.; ZAMBOLIM, L.; FERREIRA, A. S. A antracnose do sorgo. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 4, p. 345-354, 2003.

COSTERTON, J. W. *et al.* (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent Infections. **Science**, 284, pp. 1318-1322.

CRUZ, E. M. O.; JUNIOR, L. M. C.; PINTO, J. A. O.; SANTOS, D. A.; ARAUJO, S. A.; BLANK, M. F. A.; BACCI, L.; ALVES, P. B.; CAVALCANTI, S. C. H.; BLANK, A. F. Acaricidal activity of *Lippia gracilis* essential oil and its major constituents on the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 195, p. 198-202, 2013.

CUETO-WONG MC; RIVAS-MORALES CM; ALANÍS-GUZMÁN G; ORANDAYCÁRDENAS A; AMAYA-GUERRA CA; NÚÑEZ-GONZÁLEZ A; SAMANIEGO-GAXIOLA JA; CANO-RÍOS P. 2010. Antifungal properties of essential oil of mexican oregano (*Lippia berlandieri*) against *F. oxysporum f. sp. lycopersici*. **Revista mexicana de micología** 31: 29-35.

DEAN R, VAN KAN JAL, PRETORIUS ZA, HAMMOND-KOSACK KE, DI PIETRO A, ET AL. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology** 13: 414–430.

DEMUNER, A.J.; BARBOSA, L.C.A.; MAGALHÃES, C.G.; SILVA, C.J; MALTHA, C.R.A.; PINHEIRO, A.L. Seasonal variation in the chemical composition and antimicrobial activity of volatile oils of three species of *Leptospermum* (Myrtaceae) grown in Brazil. **Molecules**, v.16, p.1181-1191, 2011.

DEUS, R.J.A.; ALVES, C.N.; ARRUDA, M.S.P. Avaliação do efeito antifúngico do óleo resina e do óleo essencial de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne) **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.13, p.1-7, 2011.

DINIZ, S. P. S. S.; COELHO, J. S.; ROSA, G. S.; SPECIAN, V.; OLIVEIRA, R. C.; OLIVEIRA, R. R. Bioatividade do óleo essencial de *Mentha arvensis* L. no controle de fungos fitopatogênicos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Botucatu**, v.10, n.4, p.9-11, 2008.

DONELIAN, A. Extração de óleo essencial de patchouli *Pogon stemon* cablin (blanco) Benth utilizando dióxido de carbono supercrítico. **Tese de Mestrado**, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

DONLAPORN, S.; SUNTORNSUK, W. Antifungal activities of ethanolic extract from *Jatropha curcas* seed cake. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.20, p.319-324, 2010.

DONLAN, R. M. E COSTERTON, J. W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, 15(2), pp. 167-193. (Donlan et al., 2002)

DONLAPORN, S.; SUNTORNSUK, W. Antifungal activities of ethanolic extract from *Jatropha curcas* Seed Cake. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.20, p.319-324, 2010.

DUNNE, W. M. **Bacterial Adhesion: Seen Any Good Biofilms Lately?** **Clin Microbiol Rev.**, v. 15, n. 2, p. 155–166, 2002.

EMBRAPA CENARGEN disponível em: <http://pragawall.cenargen.embrapa.br/aiqweb/michtml/fgbd01.asp> Acessado em: 27 de junho de 2010.

ECKERT, J.W. Postharvest disease of fresh fruits and vegetables – etiology and control. In: Haard, N.F. & Salunkhe, D.K. (Eds.) Postharvest biology and handling of fruits and vegetables. Westport. **The Avi**. 1980. pp.81-117.

ECKERT, J.W. Post-harvest diseases of citrus fruits. **Agriculture Outlook** 54:225-232. 1993.

FARR, D.F., & ROSSMAN, A.Y. Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, **Disponível em:** <http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>, acessado em 27 de junho de 2010.

FERNANDES NETO, M.L.; SARCINELLI, P.N. Agrotóxicos em água para consumo humano: Uma abordagem de avaliação de risco e contribuição ao processo de atualização da legislação brasileira. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, Rio de Janeiro, v.14, n.1, p.69-78, jan. 2009.

FERRAZ, R. P. C.; et al. Cytotoxic effect of leaf essential oil of *Lippia gracilis* Schauer (Verbenaceae). **Phytomedicine**, v. 20, p. 615-621, 2013.

FLETCHER, J.; BENDER, C.; BUDOWLE, B.; COBB, W. T.; GOLD, S. E.; ISHIMARU, C. A.; LUSTER, D.; MELCHER, U.; MURCH, R.; SCHERM, H.; SEEM, R. C.; SHERWOOD, J. L.; SOBRAL, B. W.; TOLIN, S. A. Plant pathogen forensics: capabilities, needs, and recommendations. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 70, p. 450- 471. 2006.

GAVA A., STOLF L., NEVES D.S., STOLF O., VARASCHIM M.S. & FERREIRA E.M.M. 1992. Intoxicação experimental por *Prunus sellowii* (Rosaceae) em bovinos. **Pesq. Vet. Bras.** 12:1-4.

GALLETTI, J. et al. Antibiofilm activity of propolis extract on *Fusarium* species from onychomycosis. **Future microbiology**. v.12, n. 14, p. 1311-1321, 2017.

GOES, A. Doenças do abacaxi (*Ananascomusus*). In: KIMATI, H. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. Ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2, p. 9-14.

GHINI, R.; NAKAMURA, D. Seleção de antagonistas e nutrientes que induzem supressividade de solos a *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em microcosmos e in vivo. **Summa Phytopathologica**, v.27, n.3, p.318-322, 2001.

GAWEHNS F., HOUTERMAN P. M., ICHOU F. A., MICHIELSE C. B., HIJDRA M., CORNELISSEN B. J., ET AL. . (2014). The *Fusarium oxysporum* effector Six6 contributes to virulence and suppresses I-2-mediated cell death. **Mol. Plant Microbe. Interact.** 27, 336–348.

GUIMARÃES, A. G.; et al. Phytochemical characterization and antinociceptive effect of *Lippia gracilis* Schauer. **Journal of Natural Medicines**, v. 66, p. 428–434. 2012.

GULLINO, M.L. Lotta biologica a funghi agenti di marciumi della frutta in post-raccolta. **Informatore Fitopatologico** 4:5-13. 1994.

GOMES, M.S.O. Conservação pós-colheita: frutas e hortaliças. Brasília. **Embrapa-SPI**. 1996. 134 p.

GARCIA, R.Á.; JULIATTI, F.C.; BARBOSA, K.A.G.; CASSEMIRO, T.A. Atividade antifúngica de óleo e extratos vegetais sobre *Sclerotinia sclerotiorum*. **Bioscience Journal**, v.28, p.48-57, 2012.

GROSSO, C.; COELHO, J. A.; URIETA, J. S.; PALAVRA, A. M. F.; BARROSO, J. G. Herbicidal activity of volatiles from coriander, winter savory, cotton lavender, and thyme isolated by hydrodistillation and supercritical fluid extraction. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 20, p. 11007-11013, 2010.

GOMES, G. A.; MONTEIRO, C. M. O.; SENRA, T. O. S.; ZERINGOTA, V.; CALMON, F.; MATOS, R. S.; DAEMON, E.; GOIS, R. W. S.; SANTIAGO, G. M. P.; CARVALHO, M. G. Chemical composition and acaricidal activity of essential oil from *Lippia sidoides* on larvae of

Dermacentor nitens (Acari: Ixodidae) and larvae and engorged females of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 111, p. 2423- 2430, 2011.

HARDING, M. W. et al. "Filamentous Fungi Form Biofilms". In: **Trends in Microbiology**. v. 17, n. 11, p. 475-480, 2009.

HERNANDES, C.; PINA, E. S.; TALEB-CONTINI, S. H.; BERTONI, B. W.; CESTARI, I. M.; ESPANHA, L. G.; VARANDA, E. A.; FRANÇA, K.; CAMILO, B.; MARTINEZ, E. Z.; FRANÇA, S. C.; PEREIRA, A. M. S.; *Lippia origanoides* essential oil: an efficient and safe alternative to preserve food, cosmetic and pharmaceutical products. **Journal of Applied Microbiology**, v.122, p. 900–910, 2017.

HADDAD, M. J.; SARKAR, D. Glomalina, a newly discovered component of soil organic matter: Part II - Relationship with soil properties. **Environmental Geosciences**, v.10, n.3, p.99-106, 2003.

HELANDER, I.M. et al. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, p.3590-3595, 1998.

HILLEN, T. et al. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais no controle de alguns fitopatogênicos fúngicos *in vitro* e no tratamento de sementes. **Rev. bras. plantas med.** [online]. 2012, vol.14, n.3, pp.439-445.

HALL, R. Compendium of Bean Diseases. St Paul: **The American Phytopathological Society Press**, 1991. 71p.

HORST, K. Westcott's plant disease handbook. 7. ed. **New York: Springer Berlin Heidelberg**, 2008.

HUSSAR, G. J.; PARADELA, A. L.; JONAS, T. C.; SERRA, W.; GOMES, J. P. R.; PERES, M. R. Ensaio para a determinação de dosagem tóxica do fungicida tebuconazole (Folicur 200 24 CE) sobre alevinos e juvenis de tilápia (*Tilapia rendalli*) e de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Engenharia ambiental**, v. 1, n. 1, p. 35-44, 2004.

IST. Grupo de Ciências Biológicas do Instituto Superior Técnico. Universidade Técnica de Lisboa. **Crescimento microbiano em biofilmes**. Publicado em 18/11/2005, Revisto em 03/04/2008.

INDEX FUNGORUM, Disponível em: <http://www.indexfungorum.org/names/names.asp> , acessado em abril de 2010.

JAY, J.M. Biofilmes. In: _____ **Microbiologia de Alimentos**. Porto Alegre: Artmed. 6ed. , p.673-674, 711p. 2005.

JUVEN, B.J.; KANNER, J.; SCHVED, F.; WEISSLOWICZ, H. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. **Journal of Applied Microbiology**, v.76, n.6, p.626-31, 1994.

KIMATI, H.; CARDOSO, C.O.N.; BERGAMIN FILHO, A. doenças das cucurbitáceas. In: GALLI, F., ed. Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas. **Piracicaba: Ceres**. 1997. v.2.

KASNOWSKI, Maria Carmela; MANTILLA, Samira Pirola Santos; OLIVEIRA, Luiz Antônio Trindade; FRANCO, Robson Maia. **Formação de biofilme na indústria de alimentos e métodos de validação de superfícies.** *Revista Científica Eletrônica De Medicina Veterinária*, n. 15, p. 1-23, 2010.

LAMBERT RJW, SKANDAMIS PN, COOTE P, NYCHAS GJE 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol, and carvacrol. *J Appl Microbiol* **91**: 453-462.

LIMA, I. O. et al. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. v. 16, n. 2, p. 197- 201, 2006.

LIMA FILHO, R. M.; OLIVEIRA, S. M. A.; MENEZES, M. Caracterização Enzimática e Patogenicidade Cruzada de *Colletotrichum* spp. Associados a Doenças de Pós-Colheita. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.28, n.6, p.620-625, 2003.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. The *Fusarium* laboratory manual. Iowa: **Blackwell Publishing**, 2006.

LEE, Y. S. et al. Antifungal activity of Myrtaceae essential oils and their components against three phytopathogenic fungi. *Flavour and Fragrance Journal, Chichester*. V. 23, n. 1, p. 23-28, 2008.

LORENZI, H.; MATOS, Francisco José de Abreu. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. *Instituto Plantarum. Nova Odessa (SP)*. v. 1, p. 512, 544, 2002.

LUBBE, A.; VERPOORTE, R. Cultivation of medicinal and aromatic plants for specialty industrial materials. *Industrial Crops and Products*, v.34, p.785-801, 2011.

LUGINBUHL, S. de A class Project for PP728 Soil borne Pathogens, Fall 2010.

MAHMOUD, TF; O'TOOLE, GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol*. n.9, p.34-39. 2001.

MANGANYI, M. C.; REGNIER, T.; OLIVIER, E. I. Antimicrobial activities of selected essential oils against *Fusarium oxysporum* isolates and their biofilms. *South African Journal of Botany*. v. 99, p. 115-121, 2015

MONTESINOS, E. Development, registration and commercialization of microbial pesticides for plant protection. *International Microbiology*. v. 6, p. 245–252, 2003.

MARINHO, M. J. M.; et al. Estabelecimento de protocolo para micropropagação de *Lippia gracilis Schauer*. *Rev. Bras. Pl. Med.*, Botucatu, v. 13, n. 2, p. 246-252, 2011.

MOREIRA, D.M. *et al.* Plant compounds insecticide activity against coleoptera pests of stored products. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.42, n.7, p. 909-915, 2007. Disponível em: Acesso em: mai. 2008. doi: 10.1590/S0100- 204X2007000700001.

MATTOS, S.H.; INNECCO, R.; MARCO, C.A.; ARAÚJO, A.V. Plantas medicinais e aromáticas cultivadas no Ceará: tecnologia de produção e óleos essenciais. Fortaleza: **Banco do Nordeste do Brasil (série BNB - ciência e tecnologia 2)**, p. 61-63. 2007.

MOTA,C.O.; PESSOA,M.N.G.;VIANA ,F.M.P.;NETO,M.A.Efeitos de extratos e óleos essenciais de plantas medicinais no controle in vitro de *Lasioidiploidia theobromae*.*Fitopatologia Venezuelana*,v.15.p.2-6, 2002

MOTA, T. R. et al. Protein extract from *Cereus jamacaru* (DC.) inhibits *Colletotrichum gloeosporioides* growth by stimulating ROS generation and promoting severe cell membrane damage. **Microbial Pathogenesis**. v. 130, p.71-80, 2019.

MENDES, M. A. S.; URBEN, A. F.; Fungos relatados em plantas no Brasil, Laboratório de Quarentena Vegetal. Brasília, DF: **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**.

MUNIR, A. A. A taxonomic revision of the genus *Lippia* [HOUST. EX] Linn. (Verbenaceae) in Australia. **Journal of the Adelaide Botanic Gardens**, v. 15, n. 2, p. 129-145, 1993.

NASCIMENTO, J.C.; BARBOSA, L.C.A.; PAULA, V.F.; DAVID, J.M.; FONTANA, R.; SILVA, L.A.M.; FRANÇA, R.S. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Ocimum canum* Sims. and *Ocimum selloi* Benth. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.83, p.787-799, 2011.

NERY-SILVA, F.A. et al. Controle químico da podridão peduncular de mamão causada por *Colletotrichum gloeosporioides*. **Cienc. Agrotec.**, Lavras, v. 25, n. 3, p. 519-524, 2001.

NGOH, S.P.; CHOO L.E.W.; PANG F.Y.; YAN HUANG; KINI M.R.; Ho S.H. 1998. Insecticidal and repellent properties of nine volatile constituents of essential oils against the American cockroach (*Periplaneta Americana* L.). **Pesticide Science**, 54(3): 261-268.

OLIVEIRA, A. R. M. F. et al. Determinação do tempo de hidrodestilação e do horário de colheita no óleo essencial de menta. **Horticultura Brasileira**. v. 30, p. 155-159, 2012.

OLIVEIRA, C.E.L. Caracterização do óleo essencial de *Lippia gracilis* e de seus principais constituintes por termogravimetria. 2012. 115f. **Dissertação. (Mestrado em Engenharia Química)** – Universidade Estadual de Campinas, Campinas- SP, 2012.

OLIVEIRA, H. M. B. Fungos filamentosos na água formando biofilme na rede de distribuição de água potável do sistema Alto do Céu Recife -PE. **Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Pernambuco**. Recife, Pernambuco, Brasil. 80f, 2010.

OLIVEIRA, O. R. et al. Efeito de óleos essenciais de plantas do gênero *Lippia* sobre fungos contaminantes encontrados na micropropagação de plantas. **Revista Ciência Agronômica**. v. 39, n. 1, p. 94-100, 2008.

OLIVEIRA, O. R.; TERAPO, D.; CARVALHO, A. C. P. P.; INNECCO, R.; ALBUQUERQUE, C. C. Efeito de óleos essenciais de plantas do gênero *Lippia* sobre fungos contaminantes encontrados na micropropagação de plantas. **Revista Ciência Agronômica**. v. 39, n. 1, p. 94-100, 2008.

OLIVEIRA, M.M.M et al. Rendimento, composição química e atividade antilisterial de óleos essenciais de espécies de *Cymbopogon*. **Rev. bras. plantas med.** [online]. 2011, vol.13, n.1, pp.08-16. ISSN 1516-0572.

OLIVEIRA, S.J.M.; HOLANDA-FILHO, Z.F. **Aspectos econômicos, ambientais e sociais da produção cafeeira em diferentes sistemas em Rondônia**. Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2009, 6p. (Embrapa Rondônia. Comunicado Técnico, 351).

O'LEARY, N., DENHAM, S.S., SALIMENA, F., MULGURA, M.E., 2012. Species delimitation in *Lippia* section *Goniostachyum* (Verbenaceae) using the phylogenetic species concept. **Bot. J. Linn. Soc.** 170, 197e219.

PARSEK, M. R. e Singh, P. K. (2003). Bacterial Biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. **Annual Reviews Microbiology**, 57, pp. 677-701.

- PASCUAL, M. E. et al. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, n. 03, p. 201-214, 2001.
- PAULL, R.E., NISHIJIMA, W., REYES, M. & CAVALETTO, C.C. Postharvest handling and losses during marketing of papaya (*Carica papaya* L.). **Postharvest Biology and Technology** 11:165-179. 1997.
- PASSOS, J.L.; BARBOSA, L.C.A.; DEMUNER, A.J.; ALVARENGA, E.S.; SILVA, C.M.; BARRETO, R.W. Chemical characterization of volatile compounds of *Lantana camara* L. and *L. radula* Sw. and their antifungal activity. **Molecules**, v.17, p.11447-11455, 2012.
- PEREIRA, A.A., CARDOSO, M.G., ABREU, L.R., MORAIS, A.R., GUIMARÃES, L.G.L. & SALGADO, A.P.S.P. 2008b. Caracterização química e efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Ciência e Agrotecnologia**, 32(3): 887-93.
- PERINI, V.B. de M.; CASTRO, H.G. de; SANTOS, G.R. dos; AGUIAR, R.W. de S.; LEÃO, E.U.; SEIXAS, P.T.L. Avaliação do efeito curativo e preventivo do óleo essencial do capim citronela no controle de *Pyricularia grisea*. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v.2, p.23-27, 2011.
- POZZA, E.A.; SOUZA, P.E.; CASTRO, H.A.; POZZA, A.A.A. 1999. Frequência da ocorrência de doenças da parte aérea de plantas na região de Lavras-MG. **Scientific agrotechnology** 23 (4): 1001-1005.
- PORTAL PATOLOGIA DE SEMENTES disponível em
:
<http://faem.ufpel.edu.br/dfs/patologiasementes/cgibin/semestes/detalhes.cgi?praga=96>
Acesso 06/11/2010
- RAY, R. C.; RAVI, V. Post harvest spoilage of sweet potato in tropics and control measures. **Critical Reviews on Food Science**. v. 45, p. 623-644, 2005.
- RAJENDRAN, S.; SRIRANJINI, V. **Plant products as fumigants for stored-product insect control**. **Journal of Stored Products Research**, v.44, n.2, p.126-135, 2008. Disponível em: . Acesso em: 06 dez. 2008. doi:10.1016/j.jspr.2007.08.003.
- REIS, A.; GIORDANO, L. de B.; LOPES, C.A.; BOITEUX, L.S. Novel sources of multiple resistance to three races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in *Lycopersicon germplasm*. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.4, p.495-502, 2007. DOI: 10.12702/1984-7033.v04n04a19. [[Links](#)]
- RIBEIRO, S. S., et al. Evaluation of the cytotoxic activity of some Brazilian medicinal plants. **Planta Medica**, New York, v. 78, p. 1601–1606, 2012.
- SANTOS, M. M. et al. Estudos dos constituintes químicos e atividade antibacteriana do óleo essencial de *Lippia gracilis* a *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* “in vitro”. **Summa Phytopathologica**. v. 40, n. 3, p.277-280, 2014.
- Santos, A., Nunes, T., Coutinho, T.E. & Silva, M. 2016. Uso popular de espécies medicinais da família Verbenaceae no Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, pp. 980-991.
- SENHOR, R. F. et al. Manejo de doenças pós-colheita. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Mossoró, v. 4, n. 1, pp. 1-13. 2009.
- SERRA, IMRSS, COELHO, R.S.B; MENEZES, M.M. Caracterização fisiológica, patogênica e análise isoenzimática de isolados monospóricos e multiespóricos de *Colletotrichum*.

Universidade Federal de Pernambuco. **UFRPE. Departamento de Agronomia/Fitossanidade. Summa Phytopatho.** vol. 34. BOTUCATU Apr/June 2008.

SEIXAS, P.T.L.; CASTRO, H.C.; SANTOS, G.R.; CARDOSO, D.P. Controle fitopatológico do *Fusarium subglutinans* pelo óleo essencial do capim-citronela (*Cymbopogon nardus L.*) e do composto citronelal. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.13, p.523-526, 2011.

SILVA, W.J.; DORIA, G.A.A.; MAIA, R.T.; NUNES, R.S.; CARVALHO, G.A.; BLANK, A.F.; ALVES, P.B.; Alternatives to environmentally safe insecticides. **Bioresource Technology**. v.99, p.3251-3255, 2008.

SILVA, I.M.A.; LOPES, F.S.C.; PICANÇO, M.C.; BLANK, A.F.; SANTOS, A.A.; SANTOS, A.M.O.; ARAUJO, A.P.A.; SANTOS, A.C.C.; BACCI, L. Toxicidade de óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas no controle de praga. **Horticultura Brasileira**, v.29, p.4828-4835, 2011.

SILVA, I.M.A.; LOPES, F.S.C.; PICANÇO, M.C.; BLANK, A.F.; SANTOS, A.A.; SANTOS, A.M.O.; ARAUJO, A.P.A.; SANTOS, A.C.C.; BACCI, L. Toxicidade de óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas no controle de praga. **Horticultura Brasileira**, v.29, p.4828-4835, 2011.

SILVA, C.J. et al. Chemical composition and antibacterial activities from the essential oils of myrtaceae species planted in Brazil. **Química Nova**, v.33, n.1, p.104-108, 2010.

SILVA, K.J.D. **Distribuição e caracterização de isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* no Brasil**; Lavras : UFLA, 2004.88. p: il.

SILVA, C.J.; BARBOSA, L.C.A.; DEMUNER, A.J.; PINHEIRO, A.L.; DIAS, I.; ANDRADE, N.J. Chemical composition and antibacterial activities from the essential oils of *myrtaceae* species planted in Brazil. **Química Nova**, v.33, p.104-108, 2010.

SILVA, M. B.; MORANDI, M. A. B.; PAULA JÚNIOR, T. J.; VENZON, M.; FONSECA, M. C. M. Uso de princípios bioativos de plantas no controle de fitopatógenos e pragas. **Informe Agropecuário**, v. 31, n. 255, p. 70-77. 2011.

SILVA, M.A. et al. Óleo essencial de aroeira vermelha como aditivo na ração de frangos de corte. **Ciência Rural**, v.41, n.4, p.676-681, 2011.

SILVA, N. A.; OLIVEIRA, F. F.; COSTA, L. C. B.; BIZZO, H. R.; OLIVEIRA, R. A. Caracterização química do óleo essencial da erva cidreira (*Lippia alba* (Mill.) N. E. Br.) cultivada em Ilhéus na Bahia. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, n. 3, p. 52-55, 2006.

SIMÕES, L.C.; SIMÕES, M.; LIMA, N. Kinetics of biofilm formation by drinking water isolated *Penicillium expansum*. **Biofouling**. v. 31, n. 4, p. 349-362, 2015.

Siqui AC, Sampaio, ALF, Sousa MC, Henriques MGMO, Ramos, MFS 2000. Óleos essenciais - potencial antiinflamatório. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento** 16: 38-43.

SONWA, M.M. Isolation and structure elucidation of essential oil constituents: Comparative study of oils of *Cyperus alopecuroides*, *Cyperuspapyrus*, and *Cyperusrotundus*. **Tese de Doutorado**, University of Hamburg, Hamburg, 2000.

SOUZA JÚNIOR, I. T.; SALES, N. L. P.; MARTINS, E. R. Efeito fungitóxico de óleos essenciais sobre *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado do maracujazeiro amarelo. **Revista Biotemas**, v. 22, n.3, p. 77-83, 2009.

- SOUZA, A.E.F.; ARAUJO, E.; NASCIMENTO, L.C. Atividade antifúngica de extratos de alho e capim-santo sobre o desenvolvimento de *Fusarium proliferatum* isolado de grãos de milho. **Fitopatologia Brasileira**. São PauloSP. n.32, p.465-471, 2007.
- SOUZA, L.T.; MICHEREFF, S.J.; LARANJEIRA, D.; ANDRADE, D.E.G.T.; FERRAZ, E.; LIMA, G.S.A.; REIS, A. Reação de genótipos de tomateiro às raças 2 e 3 de *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*. **Horticultura Brasileira**, v.28, p.102-106, 2010.
- SOYLU, E. M.; KURT, S.; SOYLU, S. In vitro and in vivo antifungal activities of the essential oils of various plants against tomato grey mould disease agent *Botrytis cinerea*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 143, n. 3., p. 183-189, 2010.
- SOUZA JÚNIOR, I. T.; SALES, N. L. P.; MARTINS, E. R. Efeito fungitóxico de óleos essenciais sobre *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado do maracujazeiro amarelo. **Revista Biotemas**, v. 22, n. 3, p. 77-83, 2009.
- SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; CRUZ, M.E.S. Uso de plantas medicinais no controle de doenças de plantas. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, p.554-556, 2003.
- SHARMA, N.; TRIPATHI, A. Integrated management of postharvest *Fusarium* rot of gladiolus corms using hot water, UV-C and *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. essential oil. **Postharvest Biology and Technology**, v.47, p.246-54, 2008.
- TAMURA, N. K et al. Adherence and biofilm formation of *Fusarium oxysporum* isolated from a corneal ulcer. **Glob. Adv. Res. J. Med. Med. Sci.** v. 4, n. 1, p. 28–34, 2015.
- TAVARES, G.M. Controle químico e hidrotérmico da antracnose em frutos de mamoeiro (*Carica papaya* L.) na pós-colheita. 2004. 55p. **Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)** - Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- TAVARES, S.C.C. DE H. Principais doenças e alternativas de controle. In: EMBRAPA (CPATSA, Petrolina-PE). Informações Técnicas sobre a Cultura da manga no Semi-árido Brasileiro. **Brasília: EMBRAPA-SPI, Cap. V**, pp.123-156. 1995.
- TAMARI, K. & KAJI, J. Studies on the mechanism of the growth inhibitory action of fusaric acid on plants. **Journal of Bacteriology, Washitgton**, v. 41, p. 143–165, 1954.
- TREVISAN, M.T.S.; MACEDO, F.V.V.; VAN DE MEENT, M.; RHEE, IN K.; VERPOORTE, R. Seleção de Plantas com Atividade Anticolinesterase para Tratamento da Doença de Alzheimer. **Química Nova**, v. 26, p. 301-304, 2003.
- THATCHER, L. F., GARDINER, D. M., KAZAN, K., AND MANNERS, J. M. 2012. A highly conserved effector in *Fusarium oxysporum* is required for full virulence on *Arabidopsis*. **Mol. Plant-Microbe Interact.** 25:180-190.
- TIAN, J.; BAN, X.; ZENG, H.; HE, J.; HUANG, B.; WANG, Y. Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Cicuta virosa* L. var. *latisecta* Celak. **International Journal of Food Microbiology**, v. 145, n. 2, p. 464-470, 2011.
- TZORTZAKIS, N. G.; ECONOMAKIS, C. D. Antifungal activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus* L.) essential oil against key postharvest pathogens. **Innovative Food Science and Emerging Technologies, Amsterdam**, v. 8, n. 2, p. 253-258, 2007.

- VERZIGNASSI, J. R.; VIDA, J. B.; TESSMANN, D. J. *Corynespora cassicola* causando epidemias de manchas foliares em pepino 'japonês' sob estufa no norte do Paraná. **Fitopatologia Brasileira, Brasília**, DF, v. 28, n. 5, p. 570, 2003.
- SILVA, C.J. et al. Chemical composition and antibacterial activities from the essential oils of myrtaceae species planted in Brazil. **Química Nova**, v.33, n.1, p.104-108, 2010.
- VELOSO, R.A. et al. Composição e fungitoxicidade do óleo essencial de capim citronela em função da adubação orgânica. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.47, n.12, p.1707-1713, 2012.
- VIEIRA, P.R.N. et al. Chemical composition and antifungal activity of essential oils from *Ocimum* species. **Industrial Crops and Products**, v. 55, p. 267-271, 2015.
- WHEELER, T.; RUSH, C.M. Soilborne diseases. In: MALOY, O. C.; MURRAY, T. D. (Eds.) **Encyclopedia of Plant Pathology**. New York. JohnWiley & Sons. 2001b. p. 935- 947.
- WANG, X.; LIANG, G. Control efficacy of an endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* Strain BZ6-1 against peanut bacterial wilt, *Ralstonia solanacearum*. **BioMed Research International**. v. 2014, 2014.
- ZAMBOLIM, L. Manejo integrado das doenças da batata e do tomate. **Summa Phytopathologica, Botucatu**, v. 28, n. 1, p. 126, jan./mar. 2002.
- ZAMBOLIM, L., COSTA, H., VALE, F.X.R. 2000. Efeito da nutrição mineral sobre doenças de plantas causadas por patógenos de solo. In: Zambolim, L. (ed.). **Manejo integrado fitossanidade: cultivo protegido, pivô central e plantio direto**. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- ZAMBOLIM, L., COSTA, H., VENTURA, J.A. & VALE, F.X.R. Controle de doenças em pós-colheita de frutas tropicais. In: Zambolim, L. (Ed.) **Manejo integrado:fruteiras tropicais – doenças e pragas**. Viçosa. UFV. 2002. pp.443-511.