

Revista Cubana de Plantas
Medicinales, Volumen 24, Número 1 (2019)

Artículo original

**Oleo esencial de *Lippia sidoides* Cham
(alecrim-pimenta) no controle de
Macrophomina phaseolina em feijão-caupi**

Estudio del aceite esencial de *Lippia sidoides* Cham
(pimenta alecrin) para el control de *Macrophomina
phaseolina* en el frijol caupi

Study of essential oil from *Lippia sidoides* Cham
(alecrim pimenta) for control of *Macrophomina
phaseolina* in cowpea

Larisse Raquel Carvalho Dias¹ ORCID <https://orcid.org/0000-0003-4799-9723>

Ananda Rosa Beserra Santos^{2*} ORCID <https://orcid.org/0000-0001-7139-0657>

Erasmio Ribeiro Paz Filho³ ORCID <https://orcid.org/0000-0003-4760-5739>

Paulo Henrique Soares da Silva⁴ ORCID <https://orcid.org/0000-0002-0318-4795>

Candido Athayde Sobrinho⁴ ORCID <https://orcid.org/0000-0002-2221-4486>

¹Universidade Estadual do Maranhão - UEMA; São Luis/MA. Brasil.

²Universidade Federal Rural de Pernambuco -UFRPE. Recife - PE. Brasil.

³Universidade Federal de Alagoas - UFAL. Maceió - AL. Brasil.

⁴Embrapa Meio Norte; Buenos Aires, Teresina.

*Autor para la correspondencia. Correo electrónico:
anandarbsantos@gmail.com

RESUMO

Introdução: *Vigna unguiculata* (L.) Walp. (feijão-caupi), além de possuir alto valor nutricional, representa um componente básico da dieta nas regiões Norte e Nordeste do Brasil. Esta cultura, apesar de rústica, é acometida por várias doenças, dentre as quais

se destaca a podridão cinzenta do caule, causada pelo fungo *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. Devido à inexistência de produtos químicos registrados para o seu controle, estratégias alternativas têm sido estudadas, como, por exemplo, o uso de extratos e óleos essenciais de plantas. Alguns vegetais possuem propriedades fungitóxicas e fungistáticas, sendo amplamente testados no controle *in vitro* e *in vivo* de fitopatógenos, a exemplo de *Lippia sidoides* Cham.

Objetivo: Avaliar o óleo essencial de *L. sidoides* sobre o fungo *M. phaseolina*, *in vitro* e em sementes de *V. unguiculata*.

Métodos: O óleo essencial de *L. sidoides* foi obtido das folhas frescas provenientes de Teresina-PI, Brasil, extraído por hidrodestilação e analisado por CG/EMS para identificação dos constituintes. Sem diluição, foi utilizado para avaliar o crescimento micelial e produção de microesclerócios nas concentrações: C1 = 0; C2 = 0,0313; C3 = 0,0625; C4 = 0,1250 e; C5 = 0,2500 $\mu\text{L/mL}$ em meio de Batata-Dextrose-Ágar (BDA). Para o controle do fungo em sementes, avaliaram-se as concentrações: C1 = 0; C2 = 0,5; C3 = 1,0; C4 = 2,0 e; C5 = 4,0 mL/Kg de sementes. Definida a concentração eficiente para uso nas sementes, realizou-se o teste de germinação visando avaliar possível efeito fitotóxico ou alelopático.

Resultados: Os resultados mostraram que o crescimento micelial e a formação de microesclerócios foram inibidos na concentração 0,2500 $\mu\text{L/mL}$. Na semente, o controle foi efetivo com a concentração de 2 mL/Kg.

Conclusões: Este estudo oferece evidências de que o óleo essencial de *L. sidoides* apresenta efeito fungitóxico para *M. phaseolina* e não apresenta efeito fitotóxico sobre as sementes.

Palavras-chave: controle alternativo; podridão cinzenta do caule; tratamento de sementes.

RESUMEN

Introducción: El frijol caupí (*Vigna unguiculata*) posee un alto valor nutricional, y es un componente básico de la dieta en las regiones del norte y nordeste de Brasil. Este cultivo, a pesar de ser robusto, es afectado por varias enfermedades entre las cuales se destaca la podredumbre gris del tallo causada por el hongo *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. Debido a la inexistencia de productos químicos inscritos para su control, se han estudiado estrategias alternativas, por ejemplo, el uso de los extractos y los aceites esenciales de estas plantas. Algunos vegetales poseen propiedades fungicidas probadas ampliamente en el control *in vitro* e *in vivo* de fitopatógenos como *Lippia sidoides* Cham.

Objetivo: Evaluar la actividad del aceite esencial de *L. sidoides* contra el hongo *M. phaseolina in vitro* y en las semillas de *V. unguiculata*.

Métodos: El aceite esencial de las hojas frescas de *L. sidoides*, que crece en Teresina-PI, Brasil, se obtuvo mediante hidrodestilación y se analizó mediante CG/EMS para identificar los componentes. Sin dilución, se utilizó para evaluar el crecimiento

micelial y la producción de microesclerocios en las concentraciones: C1 = 0; C2 = 0,0313; C3 = 0,0625; C4 = 0,1250 y C5 = 0,2500 $\mu\text{L}/\text{mL}$ en medio de agar patata-dextrosa (APD). Para controlar el hongo de las semillas se evaluaron las concentraciones: C1 = 0; C2 = 0,5; C3 = 1,0; C4 = 2,0 y; C5 = 4,0 mL/kg de semillas. Se definió la dosis eficiente para su uso en las semillas y se realizó la prueba de germinación para evaluar el posible efecto fitotóxico o alelopático.

Resultados: Los resultados mostraron que se inhibió el crecimiento micelial y la formación de microesclerocios con la dosis de 0,2500 $\mu\text{L}/\text{mL}$. El control fue efectivo en la semilla con la dosis de 2 mL/kg.

Conclusiones: Este estudio ofrece evidencias de que el aceite esencial tiene efecto fungicida contra *M. phaseolina* y no presenta efecto fitotóxico contra las semillas.

Palabras claves: control alternativo; podredumbre gris del tallo; tratamiento de las semillas.

ABSTRACT

Introduction: Cowpea (*Vigna unguiculata*) has high nutritional value and constitutes a basic component of the diet in northern and northeastern regions of Brazil. Despite its robustness, this crop is affected by several diseases, among them the stem gray-mold rot, caused by the fungus *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. In view of the lack of chemicals registered for its control, alternative strategies have been considered, such as the use of extracts and essential oils from these plants. Some vegetables have been amply shown to have antifungal properties for *in vitro* and *in vivo* control of phytopathogens like *Lippia sidoides* Cham.

Objective: Evaluate the activity of *L. sidoides* essential oil against the fungus *M. phaseolina in vitro* and in *V. unguiculata* seeds.

Methods: Essential oil was obtained by hydrodistillation from fresh leaves of *L. sidoides* growing in Teresina, Piauí, Brazil, and analyzed by GC/EMS to identify its components. The non-dilution method was used to evaluate mycelial growth and microsclerotium formation at the following concentrations: C1 = 0; C2 = 0.0313; C3 = 0.0625; C4 = 0.1250 and C5 = 0.2500 $\mu\text{l}/\text{ml}$ in potato dextrose agar (PDA) medium. For fungus control in seeds, the following concentrations were evaluated: C1 = 0; C2 = 0.5; C3 = 1.0; C4 = 2.0 and C5 = 4.0 ml/kg of seeds. The efficient dose for use in seeds was defined and a germination test was performed to evaluate the possible phytotoxic or allelopathic effect.

Results: Results revealed mycelial growth inhibition and microsclerotium formation with the 0.2500 $\mu\text{l}/\text{ml}$ dose. Control in seeds was effective with the 2 ml/kg dose.

Conclusions: The study provides evidence that the essential oil displays antifungal activity against *M. phaseolina* and does not have a phytotoxic effect against seeds.

Key words: alternative control, stem gray-mold rot, seed treatment.

Recibido: 01/03/2018

Aprobado: 07/08/2018

INTRODUÇÃO

A importância de *Vigna unguiculata* (L) Walp (feijão-caupi) compreende alimentação, geração de emprego e fonte de renda. É alimento básico para populações das regiões norte e nordeste, mas atualmente o seu cultivo está sendo expandido pelas regiões Centro-Oeste e Sudeste do Brasil.⁽¹⁾

A espécie possui grande diversidade genética, o que lhe confere boa adaptabilidade a diferentes condições ambientais.⁽²⁾ Com relação a outras leguminosas, destaca-se pela boa adaptação a clima e solo variados, revelando forte potencial de cultivo em todo território brasileiro.⁽³⁾ Entretanto, essa cultura pode ser acometida por vários fitopatógenos que afetam a qualidade e a quantidade do produto.⁽⁴⁾

Uma importante doença que afeta a cultura do feijão-caupi em todo o mundo e especialmente no Brasil é a podridão cinzenta do caule. Essa doença é causada pelo fungo *M. phaseolina* que causa morte de sementes e plântulas, cancro e lesões cinzentas no caule, sobretudo em condições de alta temperatura e deficiência hídrica.⁽⁵⁾ O controle desse patógeno torna-se ainda mais difícil por ele possuir estruturas de resistência, denominadas microesclerócios que permitem ampliar seu potencial de inóculo e sua sobrevivência em condições adversas.⁽⁶⁾

A inexistência de produtos químicos registrados no Ministério da Agricultura e Abastecimento para o controle dessa doença em feijão-caupi,⁽⁷⁾ praticamente tem obrigado os produtores a utilizarem ilegalmente fungicidas visando controlá-la. Tal realidade vem contribuindo com o aumento do uso indiscriminado de agrotóxicos⁽⁸⁾ e, paralelamente, estimulado a busca por formas de controle alternativo, como o uso de extratos e óleos vegetais, e que constitui-se numa área bastante pesquisada, visando minimizar o uso dos agrotóxicos e seus impactos sobre o ambiente.⁽⁹⁾

Os derivados de alguns vegetais possuem propriedades fungitóxicas e fungistáticas, além de serem caracterizados como metabólitos secundários de plantas, com baixa toxicidade a humanos, sendo amplamente testados no controle *in vitro* e *in vivo* de fitopatógenos, bem como no tratamento de sementes.⁽¹⁰⁾

Exemplo de vegetais com estas propriedades é a *Lippia sidoides* Cham., conhecida vulgarmente como alecrim-pimenta, pertencente à família Verbenaceae, possui forma de vida arbustiva de substrato terrícola e autoctone, mas não é endêmica do Brasil.

Está distribuída geograficamente pelas regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste e seus domínios fitogeográficos ocorre em área da Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica.⁽¹¹⁾

Carvalho et al.,⁽¹²⁾ utilizando óleo de *L. sidoides* e *Lippia gracilis* Schauer conseguiram inibir o crescimento de *Thielaviopsis paradoxa*, agente causal da resinose do coqueiro. Tais resultados mostram que os óleos essenciais podem se constituir em mais uma ferramenta de auxílio à agricultura, especialmente à agricultura de base ecológica, por contribuir com a oferta de produtos alimentares oriundos de práticas agrícolas mais ecológicas. Em se tratando de *M. phaseolina*, Martins et al.⁽¹³⁾ ao testarem o efeito *in vitro* do óleo de *Melaleuca alternifolia* Cheel sobre o crescimento micelial, obtiveram resultados satisfatórios, onde foi constatada a sua inibição a partir da concentração de 0,2 %.

Resultados de estudos que relacionam o emprego de óleos essenciais no tratamento de sementes e seu efeito na germinação ainda são escassos. Em feijão-caupi, o óleo de *L. sidoides* não afetou nas concentrações testadas, a germinação das sementes.⁽¹⁴⁾ Em *Cereus jamacaru* De Candolle a ação dos óleos essenciais de *Cinnamomum zeylanicum* Blume e *Ocimum minimum* L. favoreceu a germinação e o vigor das sementes.⁽¹⁵⁾ Por outro lado, o óleo de citronela (*Cymbopogon winterianus* Jowitt), provocou efeito alelopático, inviabilizando seu uso para tratamento de sementes.⁽¹⁶⁾

Assim, este trabalho tem como objetivo avaliar o efeito do óleo essencial de *L. sidoides* no controle do fungo *M. phaseolina in vivo, in vitro* e nas sementes.

MÉTODOS

Material botânico e condução dos experimentos

Os experimentos foram conduzidos, no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Meio-Norte, de onde foram obtidos os isolados e as amostras de sementes utilizadas neste trabalho.

As folhas de *L. sidoides* (alecrim pimenta) foram coletadas no Núcleo de Plantas Aromáticas e Medicinais (NUPLAM) da Universidade Federal do Piauí e após identificação botânica, a exsiccata foi depositada no Herbário Graziela Barroso (TEPB) identificada sob o voucher 18743.

Extração do óleo essencial

A extração do óleo essencial foi realizada por meio do método de arraste a vapor, utilizando-se o aparelho de Clevenger, acoplado a manta aquecedora, como fonte de calor para o sistema.⁽¹⁷⁾ Em cada seção de extração foram utilizadas 200g de folhas frescas e

previamente trituradas.

Análise da composição química dos óleos

A composição química do óleo foi obtida por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), sendo as análises realizadas no Laboratório de Geoquímica Orgânica da Universidade Federal do Piauí. Para tanto, foi utilizado o cromatógrafo (GCMS-QP2010 SE, AOC-5000 auto injetor da SHIMADZU), seguindo as seguintes condições de análise: injetor 250 °C, e temperatura inicial do forno de 60 °C, apresentando uma rampa de aquecimento 3 °C por mim até 240 °C permanecendo por 10 minutos, razão Split de 1:100, temperatura da interface 350 °C e fonte de 250 °C, faixa de massa de 40 a 600 Daltons, ionização por impactos de elétrons, 70 eV. Para cromatografia dos componentes foi empregada uma coluna Rxi-5HT, 30 m × 0,25 mm, espessura do filme interno de 0,10 µm com fase estacionária de difenil dimetilpolissiloxano e Hélio como gás carreador. A identificação dos constituintes foi feita por comparação das ordens de eluição, com dados da Literatura.

Avaliação da sensibilidade do fungo ao óleo

As concentrações do óleo essencial usadas para a avaliação *in vitro* sobre o crescimento micelial e produção de microesclerócios de *M. phaseolina* foram: C1 = 0; C2 = 0,0313; C3 = 0,0625; C4 = 0,1250 e; C5 = 0,2500 µL/mL em meio de cultura BDA (Batata-Dextrose-Ágar), sendo a quantidade do meio ajustada para o peso de cada placa. O óleo essencial foi depositado no centro das placa s-de Petri (90 mm de diâmetro), sobre o meio solidificado e distribuído uniformemente com auxílio de alça de Drigalsky.

Para avaliação do crescimento micelial, imediatamente após a distribuição do óleo, foi depositado, no centro de cada placa, um disco de 5 mm de diâmetro, contendo fragmentos da cultura de *M. phaseolina* com quatro dias de idade, cultivada em BDA. Em seguida, as placas foram vedadas com filme plástico e incubadas em estufas do tipo BOD, à temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 horas. A testemunha recebeu somente o disco com as estruturas fúngicas. A avaliação consistiu na medição diária do diâmetro das colônias em dois sentidos perpendiculares, com auxílio de uma régua milimetrada, obtendo-se uma média para cada repetição, sendo esta formada por um conjunto de três placas. As avaliações foram iniciadas 24 h após a instalação do experimento e sempre no mesmo horário, até que o crescimento radial da colônia alcançou, em um dos tratamentos, o diâmetro total da placa de Petri. Com os dados obtidos, determinou-se a taxa de crescimento do fungo nas diferentes concentrações testadas, por meio da fórmula adaptada de Lilly & Barnet.⁽¹⁸⁾

$Tx = (C_{n+1} - C_n)/T$, onde: Tx = taxa de crescimento, C_n = crescimento no tempo "n" de incubação, C_{n+1} = crescimento no tempo n+1 de incubação e T = intervalo de tempo considerado, no caso, 24 horas.

Para produção de microesclerócios, a avaliação consistiu da contagem, na colônia fúngica, do número destas estruturas presentes em cinco campos circulares de 6,38 mm² por campo, previamente definidos para cada repetição, por meio de um gabarito, com distâncias de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5 cm do centro da placa, conforme metodologia definida por *Athayde Sobrinho*.⁽¹⁹⁾

O experimento foi instalado em um delineamento inteiramente casualizado, com cinco tratamentos (quatro concentrações de óleo mais uma testemunha) e quatro repetições, sendo cada repetição representada por três placas de Petri com 90 mm de diâmetro.

Na avaliação do efeito do óleo essencial sobre o controle de *M. phaseolina* em sementes, utilizou-se uma amostra de sementes de *V. unguiculata* BRS Guariba, sem danos aparentes, previamente armazenada em câmara fria, em recipientes plásticos devidamente higienizados e etiquetados. Para tanto, adotou-se a metodologia do Teste de Sanidade de Sementes (TSS), pelo método do papel de filtro.⁽¹⁹⁾ Para estas sementes foram realizados TSS prévios, que revelaram uma incidência média de 35 % de *M. phaseolina*. As sementes foram tratadas com as seguintes concentrações: C1 = 0; C2 = 0,5; C3 = 1,0; C4 = 2,0 e; C5 = 4,0 mL do óleo essencial concentrado/Kg de semente. Após a aplicação do óleo, nos respectivos tratamentos, as sementes foram agitadas por três minutos de forma a garantir a distribuição uniforme do produto, sendo, posteriormente, mantidas em frascos herméticos por um período de 12 horas, a temperatura de bancada.

Passado esse período, as sementes tratadas e a testemunha foram dispostas nas placas e incubadas por um período de sete dias a temperatura de 20±2 °C e fotoperíodo de 12 horas, sendo as avaliações realizadas ao final desse período. As sementes foram examinadas individualmente, com o auxílio de microscópio estereoscópico e de microscópio ótico, onde a identificação de *M. phaseolina* foi realizada a partir da observação das estruturas típicas do fungo sobre as sementes. O experimento foi organizado em um delineamento inteiramente casualizado, com cinco tratamentos (quatro concentrações de óleo, mais uma testemunha) e cinco repetições. Cada parcela constituiu-se de uma placa contendo dez sementes e cada repetição foi formada por oito placas, em um total de 400 sementes/tratamento. Avaliou-se a incidência de *M. phaseolina* e de outros microrganismos presentes às sementes.

Análise estatística

Os dados de incidência foram transformados em porcentagens e, juntamente com os dados obtidos para crescimento micelial do fungo e produção de microesclerócios foram submetidos à análise de variância e de regressão polinomial, para definição do modelo que melhor explique o comportamento das variáveis estudadas sendo as análises efetuadas com o auxílio do programa Assistat versão 7.7 beta.⁽²⁰⁾

Após a definição da concentração do óleo essencial mais eficiente para o controle do patógeno, procedeu-se a avaliação da germinação das sementes. Para tanto, as sementes foram submetidas ao tratamento com óleo, em iguais condições descritas no item anterior, sendo a germinação avaliada aos sete dias após a aplicação do tratamento. O ensaio foi conduzido em câmara de germinação, conforme Brasil,⁽²⁰⁾ adotando-se um delineamento inteiramente casualizado, com dois tratamentos (com e sem óleo) e quatro repetições. Os dados de percentagem de germinação foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade, utilizando o Software estatístico ASSISTAT, versão 7.7 beta.⁽²¹⁾

RESULTADOS

A composição química do óleo essencial revelou 27 compostos que representam 96,73 % da composição do óleo, tendo como constituinte principal o timol ([tabela 1](#)). O óleo essencial apresentou um rendimento de 1,3 %.

Tabela 1 - Índice de retenção (RI) e composição química do óleo essencial obtidos de *L. sidoides*, Teresina, PI, Brasil

IR	Constituinte	Porcentagem de compostos químicos (%)
850	cis-3-hexaneol	0,48
924	α -thujene	1,11
932	α -pinene	0,51
974	octen-3-ol	0,67
988	β -myrcene	2,24
1014	α -terpinene	1,6
1020	para-cymene	13,07
1024	limonene	0,75
1026	1,8-cineole	2,34
1032	cis-ocimene	0,19
1054	gama-terpinene	4,34
1065	cis sabinene hidrate	0,41
1095	linalool	0,62
1174	4-terpineol	1,66
1186	α -terpineol	0,84
1232	thymol methyl ether	2,86
1289	thymol	33,52
1298	carvacrol	0,6
1349	thymol acetate	0,31
1417	trans-caryophyllene	17,47
1439	aromadendrene	1,23
1452	α -humulene	0,94
1484	germacrene-d	1,13
1494	biciclogermacrene	2,76
1522	δ -cadinene	0,41
1577	spathulenol	0,84
1582	caryophyllene oxide	3,71

RI: índice de retenção relativo, calculado pela equação de Van den Dool. %: Porcentagem de compostos. Os compostos listados nesta tabela estão em ordem crescente de eluição em coluna Rxi-5HT, 30 m \times 0,25 mm.

Ao observar o efeito *in vitro* de concentrações de óleo essencial de *L. sidoides* sobre o crescimento micelial de *M. phaseolina*, verificou-se que, proporcionalmente ao aumento das concentrações, há redução importante nas taxas de crescimento das colônias (tabela 2).

As concentrações C4 (0,125 μ L/mL) e C5 (0,250 μ L/mL) do óleo essencial apresentaram maiores taxas de inibição do crescimento micelial do fungo. Esse efeito foi observado, especialmente, nas primeiras 72 horas, o que demonstrou um expressivo retardo no crescimento fúngico refletindo maior potencial fungitóxico destas concentrações. Os resultados da análise de regressão polinomial revelaram efeito quadrático negativo altamente significativo ($p < 0,01$) para o crescimento micelial do fungo, submetido às diferentes concentrações do óleo essencial de *L. sidoides* (Fig. 1). Os dados indicam que à medida que crescem as concentrações do óleo, ocorre uma redução significativa no crescimento micelial do

fungo.

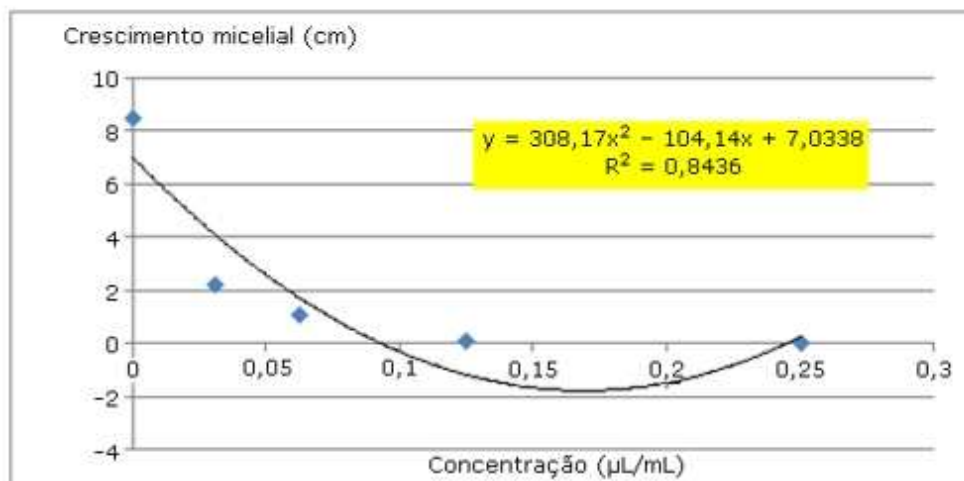


Fig. 1. Efeito *in vitro* do óleo essencial de *L. sidoides* sobre o crescimento micelial (cm).

No presente trabalho, observou-se, ainda, que ocorre uma redução significativa ($p < 0,01$) na formação de microesclerócios, com o aumento das concentrações, sendo observado, também, um efeito quadrático negativo (Fig. 2).

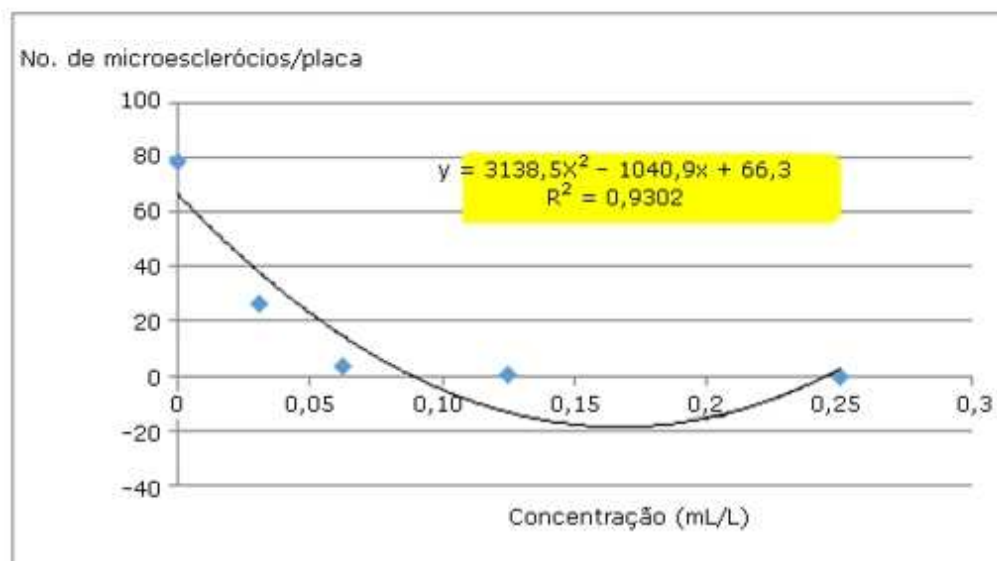


Fig. 2. Produção de microesclerócios de *M. phaseolina*, em meio BDA.

Considerando o modelo quadrático como o que melhor explica o fenômeno, verifica-se que a partir da concentração estimada de 0,093 µL/mL o crescimento do fungo é totalmente inibido. O mesmo comportamento é verificado com a concentração de estimada de 0,085 µ/mL em que a produção de microesclerócios pelo fungo é totalmente inibida.

Os resultados encontrados relativos às sementes demonstraram que, com o aumento das concentrações de óleo essencial, há

redução na incidência do patógeno, sendo observado efeito linear negativo altamente significativo ($p < 0,01$) das concentrações sobre a incidência do fungo nas sementes (Fig. 3). O controle efetivo de *M. phaseolina* foi verificado nas concentrações situadas entre 2,0 e 4,0 mL/Kg.

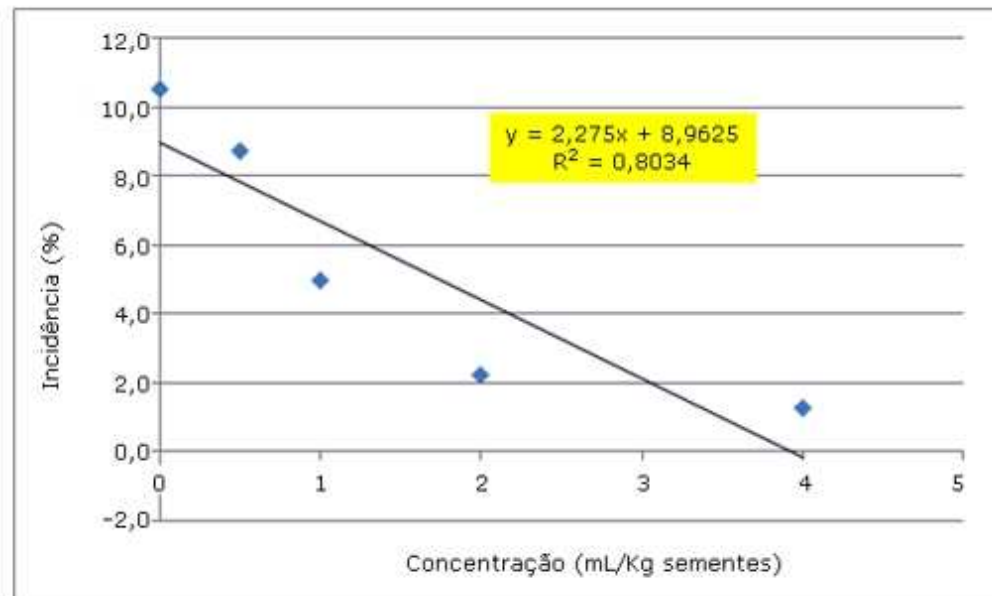


Fig. 3 - Incidência de *M. phaseolina* em sementes de *V. unguiculata* (feijão-caupi) submetidas a diferentes concentrações de óleo essencial de *L. sidoides*.

Os dados obtidos no TSS demonstram que, além da efetividade sobre *M. phaseolina*, o óleo essencial de *L. sidoides* possibilitou o controle de vários outros fungos, tais como *Alternaria alternata*, *Aspergillus* spp, *Cladosporium* sp., *Fusarium* spp., *Penicillium* sp., *Phoma* sp. e *Rizophus* sp. (tabela 3).

Tabela 3 - Incidência de fungos em sementes de *V. unguiculata* tratadas com diferentes concentrações de óleo essencial de *L. sidoides*, detectados no teste de sanidade de sementes, pelo método do papel de filtro

Fungos	Concentração (mL/Kg de sementes)				
	0	0,5	1	2	4
	Incidência (%)				
<i>Alternaria</i> sp	0,5	0	0	0	0
<i>Aspergillus</i> sp	1	4,5	0,5	0	0
<i>Cladosporium</i>	11,5	5,5	3,5	5	0
<i>Fusarium</i> spp	45	24,5	14,5	16	0
<i>Penicillium</i> sp	12	6,5	5	3	1
<i>Phoma</i> sp	0,5	0	0	0	0
<i>Rhizopus</i> sp	3,5	5,5	3	1,5	0

Em relação ao efeito do óleo essencial de *L. sidoides* sobre a germinação das sementes de *V. unguiculata*, nas concentrações efetivas para o controle de *M. phaseolina*, ficou demonstrado que o óleo não afetou a germinação ($p < 0,05$), indicando, por este aspecto, ausência de restrição ao seu emprego em tratamento de sementes.

DISCUSSÃO

O conhecimento dos constituintes químicos dos óleos essenciais é de grande importância porque pode dar uma indicação de quais substâncias podem estar relacionadas com o seu efeito fungitóxico. Os resultados encontrados neste trabalho indicam o timol como composto majoritário, cujos valores proporcionalmente são compatíveis com os obtidos por *Craveiro*⁽²²⁾ e *Teixeira*,⁽²³⁾ quando indicam que os principais constituintes voláteis frequentemente encontrados nos óleos essenciais de diferentes espécies de *Lippia* são o timol, carvacrol, 1,8- cineol, limoneno, p -cimeno, linalol, α -pineno e β -cariofileno.

Em relação ao efeito fungitóxico do óleo essencial de *L. sidoides*, verificou-se neste trabalho que baixas concentrações foram capazes de afetar significativamente o crescimento micelial, à semelhança do que foi observado por diversos autores. *Gonçalves et al.*⁽²⁴⁾ verificaram a inibição total do crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii* na concentração de 400 $\mu\text{g/mL}$ de óleo essencial de *L. sidoides*, *Tagami et al.*⁽²⁵⁾ ao fazerem uso de extrato bruto aquoso da associação de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown e *Rosmarinus officinalis* Linn., na concentração de 33,4 % obtiveram uma redução significativa de 60 % no crescimento micelial de *Alternaria alternata*. Usando apenas extrato bruto aquoso de *L. alba* a 36,4 % os autores encontraram redução em até 97 % no crescimento micelial de *Colletotrichum graminicola*, comprovando a eficiência de óleo essencial do gênero *Lippia* para controle de fungos fitopatógenos. *Fontes et al.*⁽²⁶⁾ ao utilizarem o óleo essencial de *L. sidoides*, o mesmo utilizado neste estudo, obtiveram resultados promissores no controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *in vitro*, detectando inibição de 100 % no crescimento micelial do patógeno, a partir da concentração de 0,6 $\mu\text{L/mL}$. *Silva et al.*⁽²⁷⁾ também analisaram a eficiência do óleo de *L. sidoides* e *L. gracilis* na inibição do crescimento micelial de *R. solani* e verificaram inibições do crescimento a partir das concentrações de 0,2 $\mu\text{L/L}$ e 0,4 $\mu\text{L/mL}$, respectivamente. *Martins et al.*⁽¹³⁾ avaliando óleo de *M. alternifolia* Cheel sobre o crescimento micelial de *M. phaseolina* obtiveram uma redução no diâmetro da colônia em 78,8 % e nas concentrações a partir de 0,4 % não foi possível observar crescimento micelial, havendo redução em 100%. Ao fazer uso de plantas medicinais visando ao controle desse mesmo fitopatógeno, *Prado et al.*⁽²⁸⁾ obtiveram um efeito inibidor no seu crescimento micelial a partir de 25,0 $\mu\text{L/mL}$

de BDA em óleos de alecrim-do-campo, couve-cravinho e aroeirinha e do extrato aquoso de alecrim-do-campo na mesma concentração.

Informações relacionadas à ação de óleos essenciais sobre a produção de microesclerócios não foram encontradas na literatura, sendo esta a primeira observação a esse respeito. Por outro lado, em se tratando de estruturas de resistência, no caso, clamidósporos, vale citar o trabalho de Lage⁽²⁹⁾ em que foi demonstrado o efeito inibidor do óleo essencial de mostarda sobre a germinação de clamidósporos de *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici*, à medida em que ocorreu o aumento a exposição dessas estruturas à fumigação. Estes dados tornam-se interessantes porque, conforme mencionado por Almeida et al.⁽⁶⁾ os microesclerócios constituem-se em importantes estruturas de sobrevivência e fonte de inóculo primário do fungo. Ao inibir a formação dessas estruturas, o óleo mostrou-se efetivo na quebra do ciclo das relações patógeno-hospedeiro, visto que o patógeno utiliza os microesclerócios para sobreviver em condições adversas, se propagar e dar início à doença em condições de campo.

A possibilidade de se obter um produto que apresente eficiência no controle de fungos em semente é muito promissora, uma vez que abre a perspectiva de redução do uso de fungicidas convencionais, especialmente em sistema de produção familiar, onde os membros das famílias são os próprios agricultores. Dessa forma, os dados aqui apresentados, demonstram que o óleo de *L. sidoides* mostrou-se altamente eficiente no controle de *M. phaseolina*, em concentrações semelhantes às recomendadas para alguns fungicidas convencionais, para este patógeno⁷. Relativo ao controle da incidência de fungos em sementes, Silva et al.⁽³⁰⁾ obtiveram respostas semelhantes, ao observarem redução de 68 % na incidência de *M. phaseolina* em sementes, utilizando extrato aquoso de Neem (*Azadiracta indica* A. Juss.) na concentração de 2,0 g/dm. Lobato et al.⁽³¹⁾ ao testar o óleo essencial de *Pipper aduncum* L. para o tratamento do mesmo fitopatógeno em sementes de *V. unguiculata* obtiveram a redução desse patógeno com concentração de 4,0 mL/kg, o que demonstra o potencial de óleos essenciais para o controle de fitopatógenos e robustece os resultados deste trabalho com óleo de *L. sidoides*.

No TSS Oliveira et al.⁽³²⁾ comprovaram a eficácia do óleo essencial de *L. sidoides* controlando *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp, *Fusarium* sp., e *F. oxysporum*.

Uma característica bastante requerida para produtos com potencial uso no tratamento de sementes é que seu emprego não cause fitotoxicidade. Nas condições deste trabalho, ficou patente que, nas concentrações testadas, não foi verificado efeito fitotóxico sobre sementes de *V. unguiculata*. Tal fato foi também verificado por Silva et al.,⁽³³⁾ quando verificaram que os óleos essenciais de *L. gracillis* e *L. sidoides* não afetaram a germinação de sementes dessa espécie. Diferentemente dos resultados obtidos por Xavier et al.⁽¹⁶⁾ onde foi constatado o efeito do óleo

essencial de citronela (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) sobre a germinação de sementes dessa leguminosa e identificado efeito alelopático, considerado restritivo para uso no tratamento de sementes de *V. unguiculata*. Isto demonstra que há a necessidade, para cada tipo de óleo, de estudos relacionados à fitotoxicidade e/ou alelopatia.

Os resultados obtidos permitiram concluir que o óleo essencial de *L. sidoides* inibe o crescimento micelial de *M. phaseolina* na concentração de 0,250 mL/L e a formação de microesclerócios a partir da concentração de 0,125 mL/L. Em sementes, o controle é efetivo nas concentrações situadas entre 2 e 4 mL do óleo essencial por quilograma de sementes. O poder germinativo das sementes tratadas com o óleo não é afetado na concentração efetiva, sendo o tratamento das sementes uma alternativa potencial ao emprego de fungicidas convencionais para o controle do fungo.

REFERÊNCIAS

1. Freire Filho FR, Ribeiro VQ, Rocha MM, Silva KJD, Nogueira MSR, Rodrigues EV. Feijão-caupi no Brasil: produção, melhoramento genético, avanços e desafios. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2011.
2. Freire Filho F R, Ribeiro VQ, Barreto DP, Santos AA. Melhoramento Genético. In: Freire Filho FR, Lima JAA, Ribeiro VQ. Feijão-caupi: avanços tecnológicos. Brasília: Embrapa Meio-Norte, 2005.
3. Pinho JLN, Távora FJAF, Gonçalves JA. Aspectos fisiológicos. In: Freire Filho FR, Lima JAA, Ribeiro VQ. Feijão-caupi: avanços tecnológicos. Brasília: Embrapa Meio-Norte, 2005.
4. Athayde Sobrinho C, Viana FMP, Santos AA. Doenças fúngicas e bacterianas. In: Freire Filho FR, Lima JAA, Ribeiro VQ. Feijão-caupi: avanços tecnológicos. Brasília: Embrapa Meio-Norte, 2005.
5. Athayde Sobrinho C. Patossistema caupi X *Macrophomina phaseolina*: método de detecção em sementes, esporulação e controle do patógeno. 2004. Tese. Universidade de São Paulo.
6. Almeida AMR, Gaudêncio CA, Seixas CDS, Debiasi H, Costa JM, Farias JRB, et al. *Macrophomina phaseolina* em soja. Londrina: Embrapa soja. 2014.
7. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. AGROFIT, 2017. Disponível em http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons Acesso em: 11 jan. 2017.
8. Silva MB, Nicoli A, Costa ASV, Brasileiro BG, Jamal CM, Silva CA, et al. Ação antimicrobiana de extratos de plantas medicinais sobre espécies fitopatogênicas de fungos do gênero

Colletotrichum. Rev Bras Plant Med 2008;10(3):57-0.

9. Bigaton D, Bacchi LMA, Formagio ASN, Gavassoni WL, Zanella CS. Rev Avaliação da atividade fungicida de extratos e óleos essenciais sobre ferrugem asiática da soja. Ciênc Agron 2013;44(4)757-63.

10. Rodrigues EA, Schwan-Estrada KRF, Stangarlin JR, Scapim CA, Fiori-Tutida ACG. Potencial da planta medicinal *Ocimum gratissimum* no controle de *Bipolaris sorokiniana* em sementes de trigo. Acta Scienti Agron 2006;28(2):213-20.

11. Salimena FRG, Mulgura M. *Lippia*. In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB21449> . Acesso em: 04 Nov. 2015.

12. Carvalho RRC, Laranjeira D, Carvalho Filho JLS, Souza PE, Blank AF, Alves PB, et al. In vitro activity of essential oils of *Lippia sidoides* and *Lippia gracilis* and their major chemical components against *Thielaviopsis paradoxa*, causal agent of stem bleeding in coconut palms. Chem New 2013;36(2)241-4.

13. Martins JAS, Sagata E, Santos VA, Juliatti FC. Avaliação do efeito do óleo de *Melaleuca alternifolia* sobre o crescimento micelial in vitro de fungos fitopatogênicos. Biosci J 2010;27(1)49-51.

14. Silva VM, Carvalho RRC, Rêgo TJS, Fontes MG, Blank AF, Laranjeira D. Efeitos dos óleos essenciais na germinação de sementes de feijão-caupi. In: III Congresso Nacional De Feijão-Caupi, 2013, Recife. Resumos. Recife: III CONAC, 2013a.

15. Brito NM, Nascimento LC, Coelho MSE, Félix LP. Efeitos de óleos essenciais na germinação de sementes de *Cereus jamaracu*. Rev Bras Ciênc Agrár 2010;5(2)207-11.

16. Xavier MVA, Oliveira CRF, Brito SSS, Matos CHC, Pinto MADSC. Viabilidade de sementes de feijão caupi após o tratamento com óleo essencial de citronela (*Cymbopogon winterianus* Jowitt). Rev bras plant med 2012;14 (esp) 250-4.

17. Gomes MS, Cardoso MG, Soares MJ, Batista LR, Machado SMF, Andrade MA, et al. Use of essential oils of the genus *Citrus* as biocidal agents. Americ J Plant Scienc 2014, 5, 299-305.

18. Lilly VG, Barnett HL. Physiology of the fungi. New York: McGraw-Hill. 1951.

19. Athayde Sobrinho C. Caracterização patogênica, fisiológica e morfológica de um isolado de *Plenodomus destruens* Harter, agente da podridão-do-pé da batata doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.). 1994. Dissertação, Universidade Federal Rural de Pernambuco.

20. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual de Análise Sanitária de Sementes. Brasília: Mapa/ACS,

2009.

21. Assis E, Silva FAZ. Assisat 7.7 beta. Campina Grande: UFCG, 2013.

22. Craveiro AA. Óleos essenciais de plantas do Nordeste. Fortaleza: Edições UFC, 1981.

23. Teixeira ML. Óleos essenciais de *Lippia origanoides* Kunth. e *Mentha spicata* L.: composição química, potencialidades biológicas e caracterização das estruturas secretoras. 2013. Dissertação. Universidade Federal de Lavras.

24. Gonçalves AH, Pereira AS, Santos GRS, Guimarães LGL. Atividade fungitóxicas in vitro dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* Cham., *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf. e de seus constituintes majoritários no controle de *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii*. Rev Bras Plant Med 2015;17(4)1007-1015.

25. Tagami OK, Gasparin MDG, Schwan-Estrada KRF, Cruz MÊS, Itako AT, Tolentino Júnior JB, et al. Fungitoxicidade de *Bidens pilosa*, *Thymus vulgaris*, *Lippia alba* e *Rosmarinus officinalis* no desenvolvimento *in vitro* de fungos fitopatogênicos. Semina: Ciênc Agrá 2009;30(2)285-94.

26. Fontes MG, Laranjeira D, Costa-Carvalho RR, Blank AF, Coelho IL. Atividade antifúngica de alecrim-pimenta sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 3. In: 45º Congresso Brasileiro De Fitopatologia, 2012. Resumos... Manaus: Tropical Plant Pathol.

27. Silva VM, Carvalho RRC, Rêgo TJS, Fontes MG, Blank AF, Laranjeira D. Efeito de óleos essenciais de *Lippia* na inibição do crescimento de *Rhizoctonia solani*. In: III Congresso Nacional de feijão-caupi, 2013b, Recife. Resumos... Recife: III CONAC.

28. Prado AL, Fonseca MCM, Gonçalves MG, Lehner MS, Paula Júnior TJ, Silva AF. Atividade antifúngica de óleos essenciais e extratos vegetais sobre fungos fitopatogênicos. In: Seminário De Iniciação Científica E Tecnológica, 2013. Resumos expandidos. Belo Horizonte.

29. Lage DAC. Fumigação de solo com óleo essencial de mostarda para o controle da murcha de fusário em tomateiro. 2009. Dissertação Universidade Federal de Viçosa.

30. Silva GC, Gomes DP, Santos CC. Sementes de feijão-caupi [*Vigna unguiculata* L. (Walp)], tratadas com extrato de folhas de nim (*Azadirachta indica* A. Juss.) Avaliação da germinação e da incidência de fungos. Scient Agra 2011;12(1)19-024.

31. Lobato AKS, Santos DGC, Oliveira FC, Gouvea DDS, Torres GIOS, Lima-Junior JÁ, et al. Ação do óleo Essencial de *Piper aduncum* L. utilizado como fungicida natural no tratamento de sementes de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. Rev Bras Bioc 2007,5(2)915-17.

32. Oliveira OR, Terao D, Carvalho ACP, Innecco R, Albuquerque

CC. Efeito de óleos essenciais de plantas do gênero *Lippia* sobre fungos contaminantes encontrados na micropropagação de plantas. Rev Ciênc Agron 2008;39(1)94-00.

33. Silva FAZ, Azevedo CAV. Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. In: World Congress on Computers In Agriculture, 7, Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers. 2009.

Contribución de los autores

Larisse Raquel Carvalho Dias, Ananda Rosa Beserra Santos y Erasmo Ribeiro Paz Filho realizaron el ensayo experimental.

Paulo Henrique Soares da Silva cedió el aceite esencial utilizado y toda la información referente a su uso.

Candido Athayde Sobrinho es investigador, autor del proyecto en el que se inserta el artículo. Coordinó toda la investigación y cuidó la redacción final.

Conflicto de intereses

Los autores expressam que não existe conflito de interesses.