

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

LUCIANA CRISTINA BORGES FERNANDES

**RESPOSTA BIOLÓGICA EM *Lippia gracilis* SCHAUER E *Cucumis melo* L. INDUZIDA  
PELO FUNGO *Monosporascus cannonballus* POLLACK E UECKER.**

Mossoró – RN

2014

LUCIANA CRISTINA BORGES FERNANDES

**RESPOSTA BIOLÓGICA EM *Lippia gracilis* SCHAUER E *Cucumis melo* L. INDUZIDA  
PELO FUNGO *Monosporascus cannonballus* POLLACK E UECKER.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais, da Faculdade de Ciências Exatas e Naturais da Universidade do Estado do Rio Grande do Norte como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Naturais. Área de concentração: Recursos Naturais.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Cynthia Cavalcanti de Albuquerque

Co-orientador: Prof. Dr. Rui Sales Júnior

Mossoró – RN

2014

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

Fernandes, Luciana Cristina Borges

Resposta Biológica em *Lippia gracilis* SCHAUER E *Cucumis melo* L. Induzida pelo fungo *Monosporascus cannonballus* Pollack e Uecker. / Luciana Cristina Borges Fernandes– Mossoró, RN, 2014.

71 f.

Orientador(a): Prof. Dra. Cynthia Cavalcanti de Albuquerque

Dissertação (Mestrado). Universidade do Estado do Rio Grande do Norte.  
Programa De Pós-Graduação Em Ciências Naturais – PPGCN

1. Estresse biótico - Dissertação. 2. Óleo essencial. 3. Enzimas. I. Albuquerque, Cynthia Cavalcanti de. II. Universidade do Estado do Rio Grande do Norte. III. Título.

UERN/ BC

CDD 570

LUCIANA CRISTINA BORGES FERNANDES

**RESPOSTA BIOLÓGICA EM *Lippia gracilis* SCHAUER E *Cucumis melo* L.  
INDUZIDA PELO FUNGO *Monosporascus cannonballus* POLLACK E  
UECKER.**

**Aprovada em 24 de fevereiro de 2014.**

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profª Drª Cynthia Cavalcanti de Albuquerque (Orientadora)

---

Profª Drª Érika Valente de Medeiros

---

Profª Drª Patrícia Lígia Dantas de Moraes

*A minha filhinha Leticia, meu amor verdadeiro.*

*O mais íntimo momento de mim*

**DEDICO**

*A dona Ditinha (mainha): meu referencial de sabedoria.*

*Ao meu pai, Evilásio (In memorian), meu referencial de bondade.*

**OFEREÇO**

## AGRADECIMENTOS

*A Deus, essência da criação de tudo que nos rodeia e a origem da minha força para prosseguir nos momentos difíceis dessa conquista;*

*Aos meus irmãos Adriano e Chaguinha e toda a minha família, pela força e por me trazerem alegria, paz, força para lutar e conquistar e, em algumas situações, para também recomeçar;*

*A minha orientadora, professora Dr<sup>a</sup>. Cynthia, pelos conselhos valiosos, ombro amigo, carinho e amizade. Obrigada por ter me estendido à mão no momento em que eu mais precisava de uma oportunidade. Hoje tenho bagagem científica e amadurecimento graças ao convívio diário com essa grande profissional e pessoa.*

*Ao meu co-orientador, professor Dr. Rui Sales Júnior, pela atenção, carinho e pelo grande apoio na parte experimental desse trabalho.*

*A todos que fazem o Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, pela amizade sincera e grande apoio. Destaco aqui a minha gratidão fraterna a Elen, Mônica e Val, minhas companheiras nos experimentos e grandes amigas. Nunca esquecerei os momentos vividos com vocês.*

*A Fábio Mesquita, pelos conselhos, amizade e com quem sempre pude contar na execução dos experimentos;*

*A Hailton Silva Barboza, por toda ajuda prestada na execução desse sugestões importantes para o mesmo;*

*A todos que fazem o Laboratório de Cultura de Plantas da Universidade Federal Rural de Pernambuco e, em especial, a Marciana, pelo “toque final” dado à pesquisa, por me acolher em sua residência e me dar todo o suporte que resultou no sucesso das análises;*

*Aos queridos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais e, em especial, ao secretário Thiago Mendes Fernandes, pela amizade e simpatia sempre que precisei;*

*Aos meus colegas do Mestrado: Rodrigo, Édna, Marta Vick, Manu, Samuel, Jonathan, Bruna, Laércio, Regilene, Vasco e Anderson, pelos momentos vividos e pela amizade acolhedora, bem como a Roberto, Kélia, Bárbara e tantos outros que conheci durante esses 2 anos de mestrado.*

***Assim, pois, agradeço a todos!***

*“É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar.  
É melhor tentar, ainda que em vão, que sentar-se, fazendo nada até o  
final.  
Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias frios em casa me esconder.  
Prefiro ser feliz embora louco, que em conformidade viver”.*

*(Martin Luther King)*

## RESUMO

O estresse biótico geralmente é incitado por seres vivos que atacam as plantas, por meio da produção de metabólitos secundários por elas produzidos. Tal interação planta/patógeno pode causar prejuízos na agricultura, pois alguns fungos habitam o solo e são dificilmente removidos. O fungo *Monosporascus cannonballus* Pollack & Uecker é conhecido pelo colapso que causa no meloeiro. Muitas plantas nativas da caatinga são fontes de metabólitos secundários e a espécie *Lippia gracilis* Schauer possui óleo essencial com atividade antimicrobiana comprovada devido à presença do carvacrol e do timol. Assim, o objetivo deste trabalho foi estudar o efeito do estresse biótico causado pelo fungo *M. cannonballus* na espécie *Cucumis melo* e no desenvolvimento da planta e na produção e qualidade do óleo essencial de *L. gracilis*. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com duas concentrações do patógeno (controle e 20 ufc g<sup>-1</sup> de solo) e avaliado aos 60 dias, com um total de 04 tratamentos e 4 repetições com 2 plantas cada uma, mantidas em casa de vegetação, onde as espécies *L. gracilis* e *Cucumis melo* L. tiveram suas raízes feridas para a inoculação de *M. cannonballus*. Também foram feitos experimentos *in vitro*, utilizando o óleo essencial e os extratos etanólicos de raízes e folhas de *L. gracilis* sobre *M. cannonballus*. A análise de sanidade mostrou a ausência de peritécios nas raízes de *L. gracilis* e *C. melo* e o teste de reisolamento do fungo foi positivo para a *C. melo*. A análise de crescimento mostrou um aumento de biomassa seca da raiz de *L. gracilis* no tratamento com o inóculo do fungo, bem como um aumento nos teores de carboidratos e proteínas totais. O estresse biótico também induziu um aumento na atividade das enzimas Superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Ascorbato peroxidase (APX) que, em *L. gracilis*, foram eficientes no combate ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e a peroxidação. Já para a espécie *C. melo*, houve um incremento na MDA associado a uma menor atividade das enzimas. No tocante a atividade *in vitro* do óleo essencial e extratos etanólicos de raízes e folhas de *L. gracilis* sobre *M. cannonballus*, os dados mostram um percentual de inibição de 100% para o óleo essencial em todas as concentrações testadas e também foi encontrado o mesmo percentual nas concentrações de 5000 e 7500 ppm do extrato radicular e na concentração de 7500 ppm do extrato foliar de *L. gracilis*. Quanto ao rendimento do óleo essencial de *L. gracilis* submetida ao estresse biótico por *M. cannonballus*, os dados mostraram que a produção de óleo essencial pelas plantas com o inóculo de *M. cannonballus* foi igual à produção das plantas sem o inóculo.

**Palavras chave:** estresse biótico, óleo essencial, antimicrobiana, carvacol e timol, enzimas.

## ABSTRACT

The biotic stress is usually prompted by creatures that attack plants, through the production of secondary metabolites produced by it. Such interaction plant/pathogen can cause losses in agriculture, because some fungi inhabit the soil and are difficult to dislodge. The fungus *Monosporascus cannonballus* Pollack & Uecker is known for causing the collapse of melon. Many native plants of *caatinga* are sources of secondary metabolites and the species *Lippia gracilis* Schauer has proven essential oil with antimicrobial activity due to the presence of carvacrol and thymol. Therefore, the objective of this work was to study the effect of biotic stress caused by the fungus *M. cannonballus* in the specie *C. melo* and the plant development and yield and quality of essential oil of *L. gracilis*. The experiment was performed in CRD with two pathogen concentrations (control to 20 cfu g<sup>-1</sup> soil) and 1 assessment time (60 days), with a total of 04 treatments and 4 replications with two plants each, kept in greenhouse, where the species *L. gracilis* and *Cucumis melo* L. had their roots wounded to inoculation of *M. cannonballus*. *In vitro* experiments were also performed using the essential oil and the ethanol extracts of roots and leaves of *L. gracilis* on *M. cannonballus*. The health analysis showed the absence of perithecia in the roots of *L. gracilis* and *C. melo* and the reisolation test of the fungus was positive for *C. melo*. Growth analysis showed an increase of dry biomass in the root of *L. gracilis* the treatment with the fungus, as well as increased levels of carbohydrate and protein. The biotic stress also induced an increase in the activity of Superoxide Dismutase (SOD), Catalase (CAT) and Ascorbate Peroxidase (APX) enzymes in *L. gracilis*, were effective in combating H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and peroxidation. As for the species *C. melo*, there was an increase in Malondialdehyde (MDA) associated with lower enzyme activity. Regarding the *in vitro* activity of the essential oil and ethanol extracts of roots and leaves of *L. gracilis* on *M. cannonballus*, the data show a percentage inhibition of 100% for essential oil at all concentrations tested, which was also found in the same percentage concentrations of 5000 and 7500 ppm of root extract at a concentration of 7500 ppm leaf extract of *L. gracilis*. Regarding the yield of essential oil of *L. gracilis* subjected to the biotic stress by *M. cannonballus*, data showed that the essential oil production by plants with the inoculation of *M. cannonballus* was equal to the production of plants without inoculum.

**Keywords:** biotic stress, essential oil, *antimicrobial*, carvacrol and thymol, enzymes

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> – <i>Lippia gracilis</i> Schauer	24
<b>Figura 2</b> – Colapso do meloeiro: podridão das raízes causada por <i>Monosporascus cannonballus</i>	26
<b>Figura 3</b> – Biomassa seca (g) da parte aérea de <i>L. gracilis</i> e <i>C. melo</i> sob condições de estresse biótico com <i>M. cannonballus</i>	40
<b>Figura 4</b> - Biomassa seca (g) de raíz de <i>L. gracilis</i> e <i>C. melo</i> sob condições de estresse biótico com <i>M. cannonballus</i>	41
<b>Figura 5</b> – Quantificação do conteúdo de Peróxido de Hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) em <i>L. gracilis</i> e <i>C. melo</i>	44
<b>Figura 6</b> – Atividade da SOD em <i>L. gracilis</i> e <i>C. melo</i> sob estresse biótico	45
<b>Figura 7</b> – Atividade da CAT em <i>L. gracilis</i> e <i>C. melo</i> sob estresse biótico	47
<b>Figura 8</b> – Atividade da APX em <i>L. gracilis</i> e <i>C. melo</i> sob estresse biótico	47
<b>Figura 9</b> – Peroxidação lipídica através da quantificação da Malondialdeído (MDA) em <i>L. gracilis</i> e <i>C. melo</i>	49
<b>Figura 10</b> – Percentagem de inibição do crescimento micelial <i>in vitro</i> de <i>M. cannonballus</i> pelo óleo essencial e extratos foliar e radicular de <i>L. gracilis</i>	52
<b>Figura 11</b> – Inibição do crescimento micelial <i>in vitro</i> de <i>M. cannonballus</i> pelo óleo essencial de <i>L. gracilis</i>	53
<b>Figura 12</b> – Inibição do crescimento micelial <i>in vitro</i> de <i>M. cannonballus</i> pelos extratos foliar e radicular de <i>L. gracilis</i>	53

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Teores de carboidratos, clorofila e proteínas totais em <i>L. gracilis</i> e <i>C. melo</i> submetidas a estresse biótico por <i>M. cannonballus</i>	43
<b>Tabela 2</b> – Rendimento do óleo essencial de <i>L. gracilis</i> submetidas a estresse biótico por <i>M. cannonballus</i> .	55

## LISTA DE ABREVIATURAS

**APX** – Ascorbato peroxidase  
**BSA** – Albumina de soro bovino  
**CAT** – Catalase  
**°C** – Graus Celsius  
**DIC** – Delineamento Inteiramente Casualizado  
**DTT** – Ditionitrito  
**EDTA** – Ácido Etilenodiaminotetracético  
**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** – Peróxido de Hidrogênio  
**L** – Litro  
**MDA** – Malondialdeído  
**mg** – Miligrama  
**mL** – Mililitro  
**μL** – microlitro  
**mM** – Milimol  
**NADPH** – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato  
**NBT** – Nitro blue tetrazolium  
**nm** – Nanômetro  
**<sup>1</sup>O<sub>2</sub>** – Oxigênio singleto  
**O<sub>2</sub>** – Oxigênio molecular  
**O<sub>2</sub><sup>-</sup>** – Radical superóxido  
**pH** – Potencial de Hidrogênio Iônico  
**ppm** – partes por milhão  
**PVP** – Polivinilpirrolidona  
**ROS** – Espécies reativas de oxigênio  
**rpm** – Rotações por minuto  
**SOD** – Superóxido dismutase  
**TBA** – Ácido 2-tiobarbitúrico  
**TCA** – Ácido tricloroacético

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>17</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>19</b>
2.1 Caatinga	19
2.2 Metabólitos secundários	20
2.3 <i>Lippia gracilis</i> Schauer	22
2.4 Fungos fitopatogênicos habitantes do solo na cultura do meloeiro	25
2.5 O uso de produtos naturais no controle de fungos fitopatogênicos	27
<b>3 METODOLOGIA</b>	<b>29</b>
3.1 Caracterização da área de estudo	29
3.2 Estresse biótico em plantas de <i>Lippia gracilis</i> e <i>Cucumis melo</i>	29
3.3 Análise de crescimento e sanidade	30
3.4 Determinações de carboidratos, clorofila e proteínas totais em <i>L. gracilis</i> e <i>C. melo</i>	31
3.5 Análise de enzimas do Sistema Antioxidativo de <i>L. gracilis</i> e <i>C. melo</i>	32
3.6 Avaliação do efeito do óleo essencial e dos extratos etanólicos foliar e radicular de <i>L. gracilis</i> sobre o crescimento micelial <i>in vitro</i> de <i>M. cannonballus</i>	34
3.7 Avaliação do rendimento do óleo essencial de <i>L. gracilis</i> sob estresse biótico	35
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>37</b>
4.1 Análise de sanidade nas raízes de <i>L. gracilis</i> e <i>C. melo</i>	37
4.2 Efeito do estresse biótico sobre o crescimento de <i>L. gracilis</i> e <i>C. melo</i>	39
4.3 Teores de carboidratos, clorofila e proteínas totais em <i>L. gracilis</i> e <i>C. melo</i>	41
4.4 Estresse biótico e seu efeito no Sistema Antioxidativo de <i>L. gracilis</i> e <i>C. melo</i>	43
4.5 Efeito do óleo essencial e dos extratos foliar e radicular de <i>L. gracilis</i> na inibição do crescimento micelial <i>in vitro</i> de <i>M. cannonballus</i>	49
4.6 Efeito do estresse biótico no rendimento do óleo essencial de <i>L. gracilis</i>	54
<b>5 CONCLUSÕES</b>	<b>56</b>
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>57</b>
<b>APÊNDICE</b>	<b>71</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As plantas podem estar submetidas a estresses causados por condições externas que adversamente afetam o seu crescimento e a sua produtividade. Esses estresses podem ser abióticos e bióticos, sendo os primeiros causados por excesso ou deficiência de componentes ambientais, tais como alagamento, seca, baixa ou alta temperatura, salinidade e deficiência ou excesso de minerais no solo. O estresse biótico é incitado por seres vivos que atacam as plantas, que ativam seus mecanismos de defesa através dos quais são produzidos uma ampla gama de metabólitos secundários (BONATO, 2007). Os vegetais reconhecem a presença de microorganismos patogênicos, detectando seus compostos secretados que estão interagindo com constituintes da superfície celular vegetal. Tais compostos denominam-se elicitores bióticos e desencadeiam uma série de alterações no metabolismo celular vegetal, formando uma rede de mecanismos de defesa da planta ao ataque do patógeno (BRAGA, 2008).

Embora essa interação planta/patógeno seja satisfatória no cunho industrial-medicinal, também pode causar prejuízos na agricultura, uma vez que alguns fungos causadores de doenças habitam o solo e são dificilmente removidos (BUENO et al, 2007). No oeste potiguar, por exemplo, o fungo *Monosporascus cannonballus* Pollack & Uecker é amplamente conhecido devido ao colapso causado na cultura do meloeiro, constituindo o inóculo primário para as infecções radiculares (SILVA et al, 2010). Contudo, uma das alternativas para tal problema seria o plantio, nesses solos contaminados, de espécies com propriedades medicinais que fossem resistentes ao patógeno, podendo este favorecer o aumento da quantidade e qualidade dos princípios ativos, através da elicitação.

Muitas plantas da caatinga melhoram a qualidade do solo e podem servir como fontes de produtos naturais biologicamente ativos. Pode-se destacar, dentre esses compostos químicos, os óleos essenciais, os quais são constituídos por uma mistura complexa de diversas substâncias, dentre elas os fenilpropanóides, mono e sesquiterpenos, para os quais é atribuída a atividade antimicrobiana de muitos óleos essenciais (MORAIS, 2009). Assim, há na Caatinga uma fonte promissora de óleos essenciais de espécies de sua flora medicinal uma vez que suas características climáticas marcantes fornecem um incremento na biossíntese desses óleos.

Uma espécie, oriunda da Caatinga e que vem sendo largamente estudada é a *Lippia gracilis* Schauer, pertencente à família Verbenaceae e que se caracteriza por possuir óleo

essencial odorífero, volátil, lipofílico e instável à presença de luz, calor e umidade, além de possuir atividade antimicrobiana comprovada (ALBUQUERQUE et al., 2006; CAVALCANTI et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2008; VIANA, 2010). Provavelmente, a atividade antimicrobiana deve-se à interação dos diversos constituintes, sobretudo dos monoterpenos fenólicos carvacrol e timol, os quais inibiram efetivamente patógenos como *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* (BOTELHO et al., 2007; NOSTRO et al., 2007).

Portanto, este trabalho objetivou estudar o efeito do estresse biótico causado pelo fungo *Monosporascus cannonballus* na espécie *Cucumis melo* L., bem como o seu efeito no desenvolvimento de *Lippia gracilis* Schauer e na produção e qualidade do seu óleo essencial.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Caatinga

O bioma Caatinga é o maior e mais importante da região Nordeste do Brasil, ocupando praticamente 60% de sua área e estendendo-se pelo domínio de climas semiáridos numa área de quase 100 milhões de hectares, o que representa 11% do território nacional. A Caatinga ocupa parte dos estados do Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Piauí, Bahia e uma pequena porção ao norte de Minas Gerais (ANDRADE et al., 2005). Trata-se de um bioma com uma grande variedade de tipos vegetacionais, elevado número de espécies e remanescentes de vegetação com grande número de táxons raros e endêmicos (GIULIETTE et al., 2003).

A Caatinga é caracterizada pela formação de floresta seca, composta de vegetação xerófila de porte arbóreo, arbustivo e herbáceo, com ampla variação de fisionomia e flora além de elevada diversidade de espécies, predominando os representantes de Caesalpinaceae, Mimosaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae e Cactaceae (DRUMOND et. al., 2000). A Caatinga tem uma alta diversidade florística para um bioma com forte restrição hídrica, em virtude de apresentar, também, ambientes muito distintos: de aquáticos a rupestres, de matas altas a campos abertos, incluindo encaves de matas úmidas e de cerrados. No conjunto de todas essas situações, o número de espécies de fanerógamas é de pelo menos 5344 espécies (GIULIETTI; CONCEIÇÃO; QUEIROZ, 2006).

Dentre tantas características marcantes, é também na Caatinga onde as plantas são amplamente utilizadas na medicina popular, através das comunidades locais, as quais possuem uma vasta farmacopéia natural. Para Maioli-Azevedo e Fonseca-Kruel (2007), as plantas da Caatinga são de grande importância, tanto em âmbito nacional quanto internacional, pelo fato de apresentarem um vasto potencial terapêutico e econômico que é bastante cobiçado pela indústria farmacêutica na obtenção de novos produtos.

Nesse sentido, torna-se importante o conhecimento das possibilidades de usos, locais de aquisição e as partes das plantas medicinais utilizadas para a conservação das espécies nativas, onde as feiras livres constituem-se verdadeiros mananciais e, tanto no meio rural quanto no urbano, existem pessoas que recorrem à vegetação nativa, em busca da cura de seus

problemas (MOSCA e LOIOLA, 2009). Atualmente, plantas da caatinga como Aroeira (*Myracrodruon urundeuva*), Pau-d'arco-roxo (*Tabebuia impetiginosa*), Catingueira (*Caesalpinia pyramidalis*), Jatobá (*Hymenaea courbaril*) entre muitas outras representantes de famílias botânicas da Caatinga que produzem óleo essencial são usadas frequentemente.

## 2.2 Metabólitos secundários

As plantas necessitam defender-se continuamente do ataque de agentes biológicos e de estresses do ambiente, uma vez que sua imobilidade e a falta de sistema imunológico, como ocorrem em animais, propiciaram o desenvolvimento de mecanismos de defesa, em que cada célula possui tanto capacidade de defesa induzida quanto pré-formada. Portanto, a exposição das plantas a fatores do ambiente ou abióticos e a agentes biológicos, como fungos, bactérias, vírus, nematóides, insetos e herbívoros, fazem com que elas necessitem reagir contra esses estresses (HAMMOND-KOSACK; JONES, 2000).

A resposta ao estresse por parte da planta é a ativação de seus mecanismos de defesa, pré-formada ou induzida, razão pela qual a infecção pelo patógeno resulta em danos reduzidos na planta. A defesa pré-formada é o principal mecanismo no caso de resistência não específica, em que as plantas sintetizam peptídios, proteínas e metabólitos secundários, que restringem a infecção por patógenos (SCHWAN-ESTRADA et al., 2008). Esse tipo de defesa refere-se à preexistência de barreiras estruturais e a compostos tóxicos pré-formados como a produção de lignina, enzimas hidrolíticas e fitoalexinas (STANGARLIN et al., 2011).

As plantas comumente respondem a um elicitador, que são compostos que induzem a síntese de fitoalexinas e proteínas relacionadas à patogênese podendo ser bióticos de origem microbiana ou da própria planta e abióticos, durante a qual espécies reativas de oxigênio (EROs) são geradas. A oxidação do  $O_2$  liberado da fotossíntese é catalisada por oxidases e peroxidases presentes nas membranas plasmáticas. A ativação dessas enzimas de membranas desencadeia uma reação em cascata, que causa a abertura de canais de cálcio e a ativação da NADPH oxidase presente na membrana plasmática. O estresse oxidativo resultante da geração de EROs, como superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radicais hidroxila ( $OH^-$ ) é um fenômeno comum de resposta aos estresses (BOWLER; FLUHR, 2000).

Os estresses desencadeiam a produção, por parte dos vegetais, de grande variedade de compostos orgânicos, que parecem não ter função direta no seu crescimento e desenvolvimento e são conhecidos como metabólitos secundários ou produtos naturais. Em geral, os metabólitos secundários não apresentam papéis reconhecidos diretos nos processos de fotossíntese, respiração, transporte de solutos, translocação, síntese de proteínas, assimilação de nutrientes, diferenciação ou síntese de carboidratos. (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Os metabólitos secundários representam uma interface química entre as plantas e o ambiente, pois os estímulos decorrentes do ambiente, no qual a planta se encontra, podem redirecionar a rota metabólica, ocasionando a biossíntese de diferentes compostos. É válido ressaltar que estes fatores podem apresentar correlações entre si, podendo exercer influência conjunta no metabolismo secundário. Em estudos de campo e com plantas anuais, os efeitos da sazonalidade podem ser confundidos com alterações metabólicas, oriundas do processo de desenvolvimento hormonal, controlado pela planta, devendo assim ser considerados em conjunto, onde várias são as funções químicas encontradas (MORAIS et al., 2009).

Os óleos essenciais produzidos por várias espécies de plantas são metabólitos secundários e constituem um dos mais importantes grupos de matérias primas para as indústrias de alimentos, farmacêutica, perfumaria e afins. São constituídos por uma mistura complexa de diversas classes de substâncias, dentre elas os compostos fenólicos, mono e sesquiterpenos, para os quais é atribuída a sua atividade antimicrobiana (MORAIS, 2009). Esses óleos podem ser extraídos de caules, flores, frutos e raízes de diversas espécies de vegetais aromáticos e possuem diferentes aplicações. Na indústria alimentícia podem atuar como antioxidantes e antibacterianos, além de reproduzir o sabor e o odor presentes na planta.

A designação de “óleo” é devida a algumas características físico-químicas, pois se caracterizam por serem geralmente líquidos e de aparência oleosa à temperatura ambiente. Além disso, são voláteis, característica que os diferenciam dos óleos fixos, que são misturas de substâncias lipídicas obtidas normalmente de sementes, como, por exemplo, soja, mamona e girassol. Vale ressaltar que a produção desses metabólitos tem diversas funções biológicas na planta, tais como a atração de polinizadores, a defesa contra o ataque de predadores, a proteção contra perda de água e aumento de temperatura e a inibição de germinação (SIMÕES; SPITZER, 2003).

As plantas da Caatinga sintetizam seus óleos essenciais através do metabolismo secundário que, por sua vez, pode ser influenciado por fatores bióticos e abióticos. Assim, peculiaridades climáticas desse bioma proporcionam um incremento na biossíntese dos seus óleos essenciais. De acordo com Moraes (2009), na maioria das vezes, os óleos essenciais apresentam aumento em seu teor quando as plantas produtoras se encontram em ambientes com temperaturas elevadas. Já existem na Literatura inúmeros trabalhos ressaltando a bioatividade de óleos essenciais de plantas medicinais da Caatinga a qual possui cerca de 200 plantas produtoras de óleos essenciais, dentre as quais 25 espécies possuem grande potencial para fins terapêuticos. Exemplos citados são o óleo essencial de frutos de Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi), que possui forte atividade antifúngica contra patógenos de pós-colheita (OLIVEIRA JUNIOR et al., 2013), o óleo essencial de Jambolão (*Syzygium joambolanum*) que possui atividade anticarcinogênica, antiviral e antioxidante (ONG; KHOO, 2000), a atividade antioxidante, sedativa e contra distúrbios intestinais do óleo essencial de *Croton zehntneri* e muitas outras espécies oriundas da Caatinga (MORAIS et al, 2006).

### **2.3 *Lippia gracilis* Schauer**

A família Verbenaceae caracteriza-se por reunir aproximadamente 40 gêneros e 1000 espécies e é constituída por ervas ou arbustos, menos frequentemente árvores ou lianas, muitas vezes aromáticas, com ramos geralmente quadrangulares. A família ocorre em regiões tropicais, subtropicais e temperadas, sendo os centros de mais alta diversidade as regiões subtropicais da América do Sul, além de possuir distribuição pantropical, mas principalmente neotropical, incluindo cerca de 36 gêneros e 1000 espécies, ocorrendo no Brasil 16 gêneros e cerca de 300 espécies (SOUZA e LORENZI, 2012). Entre as plantas dessa família que são utilizadas como medicinais, destacam-se as espécies pertencentes à ordem Lamiales, com 35 gêneros e 1.035 espécies, exclusivamente brasileiros e com distribuição tropical e subtropical. Os gêneros mais representativos em número de espécies são: *Verbena*, *Lippia*, *Citharexylum*, *Stachytarpheta*, *Glandularia* e *Duranta* (JUDD, 2002).

Inúmeras espécies de *Lippia* são empregadas na medicina tradicional no tratamento de patologias diversas. No Nordeste do país, essas espécies são usadas na medicina popular para o tratamento de resfriados, gripes, bronquites e tosse e essas atribuições medicinais são dadas

principalmente as folhas e as flores que são utilizadas na forma de infusão, administradas oralmente ou através de emplastos (PASCUAL, 2001). Assim, como resultado, muitas espécies de *Lippia* têm sido investigadas do ponto de vista farmacológico, revelando importantes propriedades, como é o caso do estudo da ação sedativa, antiespasmódica, e antiinflamatória de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (GOMES, 1997); o efeito antisséptico e antiinflamatório do extrato aquoso de *Lippia sidoides* Cham. e sua ação contra a malária; o emprego de *Lippia multiflora* Moldenke no tratamento de hipertensão e combate à sarna e a ação de *Lippia dulcis* Trev. no tratamento da tosse e bronquite.

A atividade antimicrobiana do gênero *Lippia* é bastante discutida e avaliada na literatura. Vários gêneros de bactérias e fungos foram submetidos à avaliação, com completa ou parcial inibição. Espécies de bactérias comumente conhecidas como *Bacillus cereus* e *Salmonella sp.* foram totalmente inibidas pela ação do óleo essencial de *Lippia origanoides* e *Lippia gracilis* (CAVALCANTI, 2006; ALBUQUERQUE et al., 2006). Vale ressaltar que, no tocante ao gênero *Lippia*, a secreção de óleos essenciais tem sido associada à presença de tricomas, os quais normalmente são de formas variadas entre grupos vegetais, mas em geral uniformes dentro de um mesmo táxon (SANTOS, 2004).

Dentre os representantes do gênero *Lippia*, uma espécie que vem sendo largamente estudada é *Lippia gracilis* Schauer (Figura 1), em virtude de possuir óleo essencial com proporções variáveis de fitoquímicos antimicrobianos de ação comprovada (ALBUQUERQUE et al., 2006; NETO et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2008; VIANA, 2010). Trata-se de um subarbusto pouco ramificado conhecido como “alecrim de chapada”, “alecrim de tabuleiro” ou simplesmente “alecrim”, sendo encontrada principalmente no estado de Pernambuco, Ceará e Rio Grande do Norte (MARRETO et al., 2008). É uma espécie que cresce em terrenos bem drenados, alcançando de 1,2 a 2 m de altura, com flores amarelo-esbranquiçadas e frutos com sementes que raramente germinam, além de folhas pequenas e aromáticas ricas em óleos essenciais (CAVALCANTI, 2006).



**Figura 1** – *Lippia gracilis* Schauer. Fonte: Arquivo Pessoal, 2014.

O óleo essencial de *Lippia gracilis* é rico em substâncias químicas como timol, carvacrol, *p*-cimeno e  $\gamma$ -terpineno, que conferem sua potente característica antimicrobiana. O óleo essencial também é externamente usado no tratamento de doenças de pele, inflamações, úlceras e até como agente larvicida no controle de espécies como o *Aedes aegypti* e *Callosobruchus maculatus* (PEREIRA et al., 2008).

Vários trabalhos evidenciam e comprovam a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Lippia gracilis* Schauer. Vale à pena citar alguns tipos de fungos como *Geotrichum candidum*, *Trichoderma viride*, *Fusiccocum sp.*, *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Penicillium sp.*, e espécies de bactérias tais como *Bacillus pumilus*, *Bacillus cereus* e *Enterobacter Hormaechei* foram completamente inibidas pela ação do óleo essencial de *L. gracilis* em pequenas concentrações (ALBUQUERQUE et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2008). Além disso, em outro trabalho a espécie *Mycobacterium tuberculosis*, conhecida por causar a tuberculose, também mostrou-se sensível à ação do óleo de *L. gracilis* comparado ao uso de drogas antimicrobianas sintéticas (CAVALCANTI, 2006). Assim, pesquisas recentes revelam o potencial promissor do óleo essencial de *Lippia gracilis* Schauer.

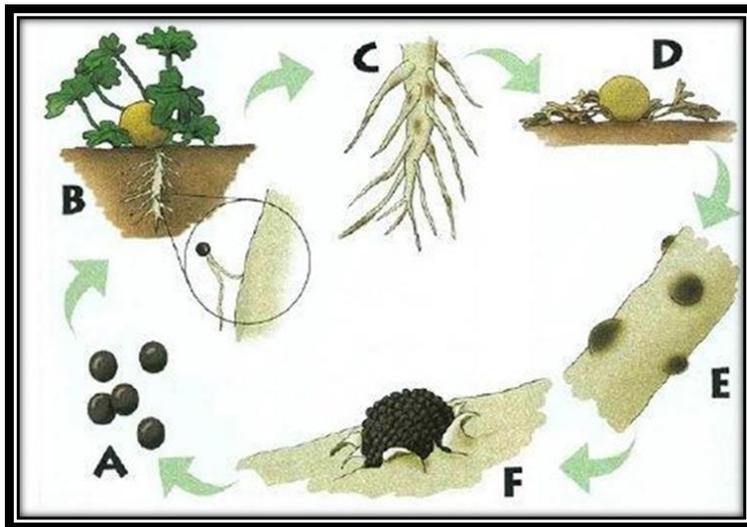
## 2.4 Fungos fitopatogênicos habitantes do solo na cultura do meloeiro

A família das Cucurbitáceas apresenta o maior número de espécies e variabilidade genética no mundo, com uma grande diversidade de características entre espécies diferentes. O melão é originário da África Equatorial, pertencente a ordem Cucurbitales, família Cucurbitaceae, gênero *Cucumis* e espécie *Cucumis melo* L. Atualmente, a produção nacional desta olerícola está em torno de 177.788 toneladas. Os principais produtores nacionais são os estados do Ceará 103.000 toneladas, Rio Grande do Norte 71.461 toneladas, Bahia 2.200 toneladas e Pernambuco 532 toneladas (DEMARTELAERE, 2011).

A espécie *Cucumis melo* L. enfrenta problemas fitossanitários associados a diferentes agentes patogênicos, como fungos, bactérias, nematóides e vírus (LOPES; REIS; LIMA, 2008). O colapso ou declínio de ramas é considerado uma doença de grande importância agrícola, tendo em vista dizimar cultivos de cucurbitáceas em todo o mundo, porém, os danos causados na raiz provocam a perda da capacidade de absorção de água pela planta e, conseqüentemente, a absorção de nutrientes necessários durante o período de maturação dos frutos, ocasionando perdas na produção de até 100% (MARTYN et al., 1996; SALES JUNIOR et al., 2003).

Muitos fungos que habitam o solo e infectam as plantas estão envolvidos no colapso, causando tombamento de plântulas ou plantas bem desenvolvidas e, ainda, dependendo da intensidade da doença, levando plantas à morte. Os principais fungos fitopatogênicos causadores de doenças em plantas são: *Fusarium sp.*, *Monosporascus cannonballus*, *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotium sp.*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Verticillium dahliae*, *Rhizoctonia sp.*, *Phytophthora sp.*, *Pythium sp.* e *Plasmodiophora brassicae*. (BUENO et al., 2007).

Dentre os fungos fitopatogênicos presentes no solo, destaca-se o *Monosporascus cannonballus* Pollack & Uecker (Figura 2), por causar sérios danos em culturas economicamente importantes. Trata-se de um patógeno radicular de muita relevância na cultura do meloeiro (*Cucumis melo* L.) e outras cucurbitáceas, acometendo a raiz de forma isolada ou em associação com outros fitopatógenos, causando a síndrome denominada “Colapso”. O fungo foi citado pela primeira vez no Arizona em melões do tipo Cantaloupe, o qual não foi identificado (TROUTMAN; MATEJKA, 1970), sendo referido apenas no ano de 1974, quando Pollack e Uecker o descreveram em raízes de meloeiro, sendo sua primeira referência



**Figura 2 – Colapso do meloeiro: podridão das raízes causada por *Monosporascus cannonballus*.** A: Ascósporos maduros no solo; B: Ascósporos germinados na rizosfera e infecção das raízes; C: Lesões necróticas nas raízes; D: Sintomas visíveis no campo e morte das plantas; E: Peritécio formado e infectando o sistema radicular; F: Peritécio relançando os ascósporos no solo. Fonte: SENHOR et al., (2009).

Assim, *M. cannonballus* é um ascomiceto, pirenomiceto, homotático, com hifas septadas, hialinas, cuja largura encontra-se entre 7,5 e 14  $\mu\text{m}$  (WATANABE, 1979). Destacam-se pela formação de peritécios que possuem formas globosas de 500 $\mu\text{m}$  de diâmetro e coloração preta, aparecendo no final do ciclo da doença infiltrados em raízes afetadas (SALES JR et al., 2002). Tais peritécios formam ascas piriformes, de parede grossa, com tamanho de 56-90 x 30-55  $\mu\text{m}$ , que possuem um anel periapical não funcional, apresentando apenas um ascósporo em seu interior (GARCIA-JIMENEZ et al., 1994, BELTRÁN, 2006).

Os ascósporos de *M. cannonballus* são multinucleados e podem conter de um a seis núcleos, possuindo a forma de uma esfera perfeita, com um diâmetro de 30 a 50  $\mu\text{m}$  e de coloração preta, sendo marrom antes de sua maturação (SIVANESAN, 1991). O nome *M. cannonballus* é uma alusão referente à sua forma que lembra uma bala de canhão (POLLACK; UECKER, 1974). Outra característica é que em meio de cultura podem apresentar dois tipos de colônia: a primeira, de rápido crescimento, de cor branca, podendo ficar mais escuras com o tempo, formando peritécios com 20 a 30 dias de cultivo (MARTYN et al., 1992). O outro tipo de colônia é de crescimento rápido com coloração amarela, nunca formando peritécios e possuindo baixa patogenicidade (GARCÍA-JIMÉNEZ et al., 1994).

*M. cannonballus* é bem adaptado ao clima Semiárido da Caatinga, com temperatura ótima de crescimento entre 25 e 35°C, sendo inibido em temperaturas acima de 40°C e abaixo de 15°C. (PIVONIA et al., 2002; MEDEIROS et al., 2006) e é descrito como fitopatógeno de cucurbitáceas em todo o mundo (STANGHELLINI et al., 2001; SALES JR. et al., 2002). Os danos causados por *M. cannonballus* também podem ser observados em plantas que não pertencem à família das cucurbitáceas. Entretanto, Mertely et al., (1993) afirmam que relatos em espécies que não sejam da família das cucurbitáceas pode não ter importância agrícola. Sivanesan (1991) o descreveu na gramínea *Triticum aestivum* (trigo), sendo observado também em grandes cultivos como milho (*Zea mays*); sorgo (*Sorgum bicolor*) e feijão (*Phaseolus vulgaris*) (MERTELY et al., 1993). Este fungo também foi encontrado como sendo patógeno de papilionáceas como *Medicago sativa* (POLLACK; UECKER, 1974) e em outras espécies como trevo (*Trifolium pratense*), gergelim (*Sesamum indicum*), *Iris sp*, *Achyranthes aspera* na Índia (HAWKSWORTH; CICARONE, 1978), tomate (*Lycopersicon esculentum*), algodão (*Gossypium hirsutum*) e brócolis (*Brassica oleracea*). Como o inóculo primário do fungo são os ascósporos das raízes que se mantêm no solo, o controle desta doença vem sendo feito com a detecção e quantificação do inóculo de *M. cannonballus* no solo (WAUGH et al., 2003) e também é feito um controle químico a base de fungicida e uso de outros fumigantes, de forma isolada ou em combinação com a solarização do solo (COHEN et al., 2000). Todavia, o uso intensivo desses produtos no controle de doenças, pragas e plantas invasoras na agricultura, tem causado diversos problemas de ordem ambiental, como a contaminação dos alimentos, do solo e da água (BETTIOL; MORANDI, 2009).

## **2.5 O uso de produtos naturais no controle de fungos fitopatogênicos**

Um fator indispensável para a agricultura sustentável é o controle alternativo de doenças de plantas, o qual tem sido discutido amplamente no contexto atual, onde muitos produtos naturais, como os extratos e os óleos essenciais de plantas medicinais, tanto condimentares quanto aromáticas, apresentam potencial no manejo de doenças de plantas. Assim, os óleos essenciais e seus constituintes podem atuar como agentes fungistáticos e/ou fungicidas, dependendo das concentrações utilizadas. Dessa forma, o mesmo óleo pode ser ativo contra um amplo espectro de micro-organismos (ANTUNES; CAVACOB, 2010).

O potencial antimicrobiano dos óleos essenciais de eucalipto (*Eucalyptus globulus*), capim-limão (*Cymbopogon citratus*) e menta (*Mentha arvensis*) foi comprovado sobre o fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, através da total inibição do crescimento micelial desse patógeno (TYAGI; MALIK, 2011; CARNELOSSI et al, 2009). De forma semelhante, Tian et al. (2011) comprovaram que o óleo essencial de endro (*Anethum graveolens* L.) reduziu o crescimento micelial dos fungos *Aspergillus flavus*, *A. oryzae*, *A. niger* e *Alternaria alternata*, causadores da deterioração do tomate cereja.

As propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais devem-se a sua característica lipofílica e a hidrofobicidade, o que proporciona 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). Comprovou-se por meio de microscopia eletrônica de varredura, que a parede, membrana e organelas celulares do fungo *A. niger* mostraram graves danos quando tal fungo foi exposto a concentrações mínimas inibitórias dos óleos essenciais de *Thymus eriocalyx* e *T. x-porlock* (RASOOLI et al., 2006). Os autores detectaram também, que o micélio deste patógeno apresentou alterações morfológicas nas hifas, interrupção e destruição das membranas plasmáticas e mitocondriais. Costa et al. (2011) avaliando o efeito do óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) sobre o fungo *R. solani*, também observaram diferentes alterações morfológicas nas hifas.

Os fungicidas originados de plantas são utilizados há séculos e pesquisas envolvendo a procura de fungicidas obtidos de plantas só vêm aumentando nos últimos 20 anos (MAKINDE et al., 2007; NASCIMENTO et al., 2008; TAGAMI et al., 2009, VENTUROSOS, 2009). Atualmente, pesquisas *in vitro* demonstram que diversos patógenos podem ser controlados com eficiência por meio de extratos e óleos vegetais Além da atividade antifúngica *in vitro*, os pesquisadores têm investigado formas alternativas de utilizar o controle de fitopatógenos, pois é uma forma de propiciar um controle sem desencadear os problemas provocados pelos fungicidas sintéticos que causam desequilíbrios ambientais nas culturas e demais populações vegetais e animais no ecossistema (COSTA et al., 2011).

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Caracterização da área de estudo

O trabalho foi realizado no município de Mossoró, que está situado na região semiárida do Nordeste brasileiro, no estado do Rio Grande do Norte, localizado pelas coordenadas geográficas 5° 11' de latitude sul, 37° 20' de longitude W. Gr. com 18m de altitude, com uma temperatura média anual em torno de 27,5 °C, umidade relativa de 68,9%, nebulosidade média anual de 4,4 décimos e precipitação média anual de 673,9mm. Segundo classificação climática de Köppen, o clima de Mossoró-RN é do tipo BSw<sup>h</sup>, ou seja, quente e seco, tipo estepe, com estação chuvosa no verão atrasando-se para o outono (CARMO FILHO et al., 1987).

#### 3.2 Estresse biótico em plantas de *Lippia gracilis* e *Cucumis melo*

O experimento foi montado na casa de vegetação do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Universidade do Estado do Rio Grande do Norte (UERN), utilizando-se as duas espécies: *Lippia gracilis* e *Cucumis melo*. Por se tratarem de espécies distintas, a inoculação do fungo nas plantas procedeu-se de forma diferente.

Para *L. gracilis*, estacas com aproximadamente 20 cm de altura foram retiradas, com auxílio de uma tesoura de poda, de plantas matrizes mantidas no campus central da UERN. As estacas foram plantadas em vasos de polietileno com capacidade para 8L, contendo substrato composto de areia lavada, argila e composto comercial Polifértil<sup>®</sup> na proporção de 3:1:1/2, o qual passou por autoclavagem antes de ser distribuído nos vasos. As estacas tiveram, inicialmente, duas regas manuais e, após brotação, passaram a ter apenas uma rega manual. Após 60 dias de estabelecimento das plantas, foi induzido o estresse biótico com *M. cannonballus*, através da inoculação da suspensão dos patógenos nos vasos contendo as plantas. A suspensão do fungo foi preparada no Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal Rural do Semiárido (UFERSA) a partir de vinte placas de Petri contendo o fungo previamente crescido. O conteúdo de todas as placas (micélio + meio de cultura) foi homogeneizado em liquidificador com 1 litro de água destilada.

A inoculação foi realizada conforme técnica de MENEZES e SILVA-HANLIN (1997), através da formação de um pequeno sulco, com o auxílio de uma faca, em torno das raízes próximas ao colo. A suspensão do inóculo de *M. cannonballus* (20 mL) foi vertida em torno das plantas, fechando-se o pequeno sulco com solo do próprio vaso. Nas plantas controle, a inoculação foi realizada utilizando-se a mesma técnica, porém ao invés do inóculo com o fungo, utilizou-se a mesma medida de água destilada.

Para *Cucumis melo* L., o inóculo foi vertido no substrato antes do plantio das mudas, as quais foram previamente plantadas em sementeiras na casa de vegetação da UFERSA e, após estabelecimento, foram trazidas para a casa de vegetação da UERN e plantadas nos vasos 48 horas após a inoculação do patógeno.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), com 4 tratamentos: T<sub>1</sub> (*L. gracilis* sem o inóculo de *M. cannonballus*), T<sub>2</sub> (*L. gracilis* com o inóculo de *M. cannonballus*), T<sub>3</sub> (*C. melo* sem o inóculo de *M. cannonballus*), T<sub>4</sub> (*C. melo* com o inóculo de *M. cannonballus*) e 4 repetições, com 2 plantas para cada repetição, perfazendo um total de 32 plantas.

### 3.3 Análise de crescimento e sanidade

Para fins de análise de crescimento, primeiramente a parte aérea foi coletada separadamente e posta a secar em estufa de circulação forçada de ar a 40 °C, até atingir peso constante. Em seguida, o peso seco foi determinado em balança analítica de precisão. O peso seco da parte radicular foi determinado após a análise de sanidade, sendo posto a secar em estufa a 70°C.

No tocante a análise da sanidade, o sistema radicular de plantas de *L. gracilis* e *C. melo* foi separado da parte aérea e levado para o Laboratório de Fitopatologia da UFERSA para análise. Com auxílio de uma lupa, procedeu-se a procura de peritécios de *M. cannonballus* e sinais de sua infecção. Para tanto, segmentos radiculares contendo sintomas característicos da infecção fúngica, foram submetidos ao seguinte processo de desinfestação: álcool a 70% por 2 minutos, hipoclorito de sódio a 2,5 % por 2 minutos e lavagem em água destilada, sendo finalmente postas para secar em papel-toalha. A análise foi direcionada à procura de sinais de

infecção nas raízes laterais e próximas ao colo da planta, pois são locais onde habitualmente o fungo se encontra.

Posteriormente, foi realizado o isolamento das raízes em meio BDA (Batata-Dextrose-Agar) adicionado de 500 mg.L<sup>-1</sup> de estreptomicina. Um total de oito fragmentos de isolamento, preferencialmente das zonas afetadas, foram efetuados por planta, com o auxílio de um bisturi devidamente esterilizado. As placas foram mantidas por 3 a 5 dias em BOD a 29 °C. Foram avaliadas visualmente todas as raízes (8 amostras) de cada tratamento para avaliação da infecção, onde o critério utilizado foi a presença ou ausência de *M. cannonballus* nas raízes que foram inoculadas. As amostras foram submetidas à análise de variância e as médias comparadas pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de significância pelo software ESTAT<sup>®</sup>.

### **3.4 Determinações de carboidratos, clorofila e proteínas totais em *L. gracilis* e *C. melo***

Quanto à determinação dos teores de carboidratos totais, aproximadamente 0,1 g de folhas foi triturada com 20 mL de etanol a 80% a 65 °C e o extrato resultante foi filtrado com papel filtro, que foi lavado três vezes sempre incorporando o líquido de lavagem ao filtrado, o qual foi transferido para um balão volumétrico de 50 mL. Para a quantificação dos carboidratos totais seguiu-se o método fenol-sulfúrico (DUBOES et al., 1956), onde realizaram-se diluições (2 mL do extrato alcoólico, completando o volume com água deionizada para 10 mL). Em seguida, foi retirada uma alíquota de 250 µL de fenol a 5%. Os tubos foram agitados e adicionaram-se 1,25 mL de ácido sulfúrico concentrado, agitando-se novamente. Posteriormente, os tubos permaneceram em banho-maria a 30 °C, durante 20 minutos. As leituras foram realizadas no espectrofotômetro, no comprimento de onda de 490 nm. Os valores obtidos foram comparados com a curva padrão de sacarose a 1%. Foram utilizadas, para essas análises, 4 amostras de cada tratamento, sendo submetidas à análise de variância e ao Teste de Tukey ao nível de 5% de significância pelo software ESTAT<sup>®</sup>.

Para a extração e determinação do conteúdo de clorofila, foram utilizadas folhas, das quais foram colhidas amostras de 100 mg de material fresco, o qual foi incubado em banho-maria com 7 mL de DMSO (dimetilsulfóxido) por duas horas a 65 °C, sem maceração foliar. A solução obtida foi filtrada, o volume foi corrigido para 10 mL com DMSO e em seguida realizou-se a leitura em espectrofotômetro considerando-se a densidade óptica medida a 645 e 663

nm (BORGHEZAN et al., 2003). Para o cálculo das clorofila a “Chla” e clorofila b “Chlb” foram utilizadas as fórmulas:  $Chla = [0,0127 \times (663nm) - 0,00269 \times (645nm)]$  e  $Chl\ b = [0,0229 \times (645nm) - 0,00468 \times (663nm)]$ . A clorofila total foi a soma da “Chla” e “Chlb”.

As proteínas foram extraídas utilizando-se tampão de extração constituído de TRIS – HCl pH 6,8 – 4 mL +  $\beta$ -mercaptoetanol – 1,6 mL + SDS 10% - 6,4 mL + glicerol – 6,4 mL + DMSO – 3,2 mL + PVP – 2g + 10,4 mL de água destilada (STEFANUTO, 2002). A quantificação foi realizada através da reação do Biureto (GORNALL et al., 1949) através de espectrofotômetro a 540 nm.

### 3.5 Análises de Enzimas do Sistema Antioxidativo de *L. gracilis* e *C. melo*

Para as determinações das atividades enzimáticas, primeiramente as amostras foram coletadas antes do desmonte do experimento na casa de vegetação do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCTV) da UERN. Em seguida, foram congeladas em nitrogênio líquido, armazenadas em gelo seco e transportadas para o Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas (LCTP) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Primeiramente, procedeu-se a maceração em nitrogênio líquido e, em seguida, uma segunda maceração e homogeneização com tampão de fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5), 1 mM de EDTA (ácido etilenodiaminotetracético), 3 mM de DL-ditiotreitol e 20% de PVPP sob temperatura de – 4 °C (Azevedo et al. 1998). O homogeneizado foi centrifugado a 10.000g durante 30 min e o sobrenadante em separado em alíquotas e mantido armazenado a –20 °C até a determinação da atividade enzimática.

**Atividade da catalase (CAT):** A atividade da CAT foi determinada pelo método descrito por Havir e Mchale (1987) com modificações, conforme Azevedo et al. (1998). Em solução contendo 1 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) e 25  $\mu$ L de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) a 1 mM. A reação foi iniciada pela adição de 25  $\mu$ L do extrato proteico e a atividade determinada seguindo-se a decomposição do  $H_2O_2$  por 60 segundos, através das alterações a 240 nm, sob temperatura de 25 °C, em espectrofotômetro.

**Ascorbato peroxidase (APX):** A atividade da APX foi determinada conforme descrito por Nakano e Asada (1981). O meio de reação composto por 650  $\mu$ L de tampão fosfato de potássio 80 mM, pH 7,5, 100  $\mu$ L de ascorbato 5 mM, 100  $\mu$ L de EDTA 1 M, 100  $\mu$ L de  $H_2O_2$  1 mM e 50

$\mu\text{L}$  do extrato protéico. A atividade da APX foi determinada pelo monitoramento da taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm, a 30 °C, durante 60 segundos, em espectrofotômetro.

**Atividade de superóxido dismutase (SOD):** O protocolo foi padronizado de acordo com Giannopolitis e Ries (1977). Por esse método, é determinada a inibição da redução do NBT (nitro blue tetrazolium) pelo extrato enzimático, evitando assim a formação do cromóforo. A solução de reação (3 mL) foi constituída de 85 mM de tampão fosfato (pH 7,8), 75  $\mu\text{M}$  de NBT, 5  $\mu\text{M}$  riboflavina, 13 mM de metionina, 0,1 mM EDTA e 50  $\mu\text{l}$  de extrato enzimático. A solução foi adicionada em tubos de vidro e irradiada com luz branca (lâmpada fluorescente de 15 W) por 5 min. Após esse período de exposição, a solução foi analisada por espectrofotômetro a 560 nm.

**Quantificação de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ):** O peróxido foi quantificado segundo protocolo de Alexieva et al. (2001). As amostras frescas foram maceradas com ácido tricloroacético (TCA) 0,1% na relação de 1 g/10 mL (w:v). As amostras foram centrifugadas a 10.000g por 15 min, a 4 °C. Do sobrenadante, foi retirado 200  $\mu\text{L}$  ao qual foi adicionado 200  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) e 800  $\mu\text{L}$  de solução 1 M de iodeto de potássio. As amostras permaneceram em gelo e no escuro durante uma hora. Após este período, as amostras foram retiradas do gelo e mantidas em temperatura ambiente para estabilização da reação, e em seguida foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 390 nm.

**Quantificação de Malondialdeído (MDA):** A peroxidação lipídica foi determinada de acordo com Health e Packer (1968), com modificações. A reação foi determinada através da produção de malondialdeído (MDA), um metabólito reativo a ácido 2-tiobarbitúrico (TBA). Amostras biológicas foram maceradas em TCA 0,1% na proporção de 0,2g/2mL de tampão, juntamente com 20% de PVPP (polivinilpolipirrolidona). Após homogeneização, a amostra foi centrifugada a 10.000g durante 5 min. Em seguida, retirou-se 0,25 mL do sobrenadante e transferiu-se para outro tubo juntamente com 1,0 mL de solução contendo 20% de TCA e 0,5% de TBA. A mistura foi mantida em banho-maria a 95 °C durante 30 min, e em seguida, sofreu rápido resfriamento por 10 min. Antes da leitura em espectrofotômetro a 535 e 600 nm, as amostras foram centrifugadas por mais 10 min a 10.000g.

### **3.6 Avaliação do efeito do óleo essencial e dos extratos etanólicos foliar e radicular de *L. gracilis* sobre o crescimento micelial *in vitro* do fungo *M. cannonballus***

A fim de verificar o efeito do óleo essencial e dos extratos foliar e radicular de *L. gracilis* no crescimento micelial do fungo *M. cannonballus in vitro*, foi realizado um ensaio, nos meses de outubro e novembro de 2013.

No experimento dos extratos, raízes e folhas de *L. gracilis* foram separadas, pesadas e secas em estufa com circulação de ar por 72 horas. Em seguida, o material vegetal foi triturado separadamente e colocado em recipiente de vidro âmbar contendo 8L de etanol a 70% para maceração sob agitação ocasional. Durante um período médio de quatro semanas realizou-se outras duas macerações com a renovação do líquido extrator do material. O líquido extraído passou por uma primeira filtração em papel de filtro sobre pressão reduzida e uma segunda filtração por gravidade com funil fechado com algodão. O filtrado em seguida foi concentrado em rotaevaporador sob pressão reduzida à temperatura de  $\pm 80$  °C, para separação do etanol. A solução obtida foi colocada em banho Maria a uma temperatura constante de 65 °C para evaporação da água e obtenção do material sólido. Após esse procedimento, os extratos secos tanto de folha quanto de raiz foram diluídos para obtenção das concentrações testadas: 2500, 5000 e 7500 ppm. Os extratos foram adicionados ao meio BDA (batata, dextrose, ágar), o qual foi autoclavado por aproximadamente 15 minutos.

Além dos extratos, testou-se também o óleo essencial de *L. gracilis*, o qual foi extraído de folhas através do processo de hidrodestilação utilizando-se o aparato de Clevenger. Nesse caso, o óleo foi acrescentado ao meio BDA após a sua autoclavagem e resfriamento a 45 °C. As concentrações avaliadas foram: 255, 340 e 425 ppm. Para critérios de comparação, foi estabelecido um meio sem adição de extratos vegetais que serviu como controle negativo e um tratamento contendo o fungicida Captan<sup>®</sup>. Em câmara de fluxo laminar, 20 mL dos meios de cultura foram vertidos em placas de Petri. O experimento foi inteiramente casualizado (DIC) contendo 11 tratamentos e 4 repetições, com 3 placas para cada repetição, perfazendo um total de 132 placas, sendo 12 placas para cada tratamento, os quais tiveram a seguinte descrição: T<sub>1</sub> (controle negativo), T<sub>2</sub> (controle positivo com o fungicida Captan<sup>®</sup>), T<sub>3</sub> (óleo essencial de *L. gracilis* na concentração de 255 ppm), T<sub>4</sub> (óleo essencial de *L. gracilis* na concentração de 340 ppm), T<sub>5</sub> (óleo essencial de *L. gracilis* na concentração de 425 ppm), T<sub>6</sub> (extrato radicular de *L.*

*gracilis* na concentração de 2500 ppm), T<sub>7</sub> (extrato radicular de *L. gracilis* na concentração de 5000 ppm), T<sub>8</sub> (extrato radicular de *L. gracilis* na concentração de 7500 ppm), T<sub>9</sub> (extrato foliar de *L. gracilis* na concentração de 2500 ppm), T<sub>10</sub> (extrato foliar de *L. gracilis* na concentração de 5000 ppm) e T<sub>11</sub> (extrato foliar de *L. gracilis* na concentração de 7500 ppm).

Discos de micélio do fungo com aproximadamente 3 mm de diâmetro foram retirados de culturas com 5 dias em meio de BDA (batata, dextrose, ágar) e inoculados no centro de placas de Petri contendo os diferentes tratamentos. As avaliações tiveram início 48 horas após a instalação do experimento e a variável avaliada foi o crescimento micelial, o qual foi medido através de medições diametralmente opostas com auxílio de um paquímetro. As avaliações finalizaram-se quando o tratamento controle atingiu o máximo de crescimento dentro dos limites da placa de Petri. Para determinar a porcentagem de inibição, os dados do crescimento micelial individual de cada fungo foram usados, por meio da aplicação da fórmula adaptada de Edington et al (1971):  $I = [(CFC - CFT) / CFC] \times 100$ , Onde: I = porcentagem de inibição; CFC = crescimento do fungo no controle; CFT = crescimento do fungo no tratamento.

### **3.7 Avaliação do rendimento do óleo essencial de *L. gracilis* submetidas ao estresse biótico**

Para avaliação do rendimento e composição química dos óleos essenciais, folhas de todos os tratamentos de *L. gracilis* sem o inóculo (T<sub>1</sub>) e com o inóculo de *M. cannonballus* (T<sub>2</sub>) foram separadamente coletadas na casa de vegetação da Universidade do Estado do Rio Grande do Norte (UERN) e foram postas a secar em estufa de circulação de ar a 40 °C. O processo de extração dos óleos essenciais foi realizado empregando-se o método de hidrodestilação, através do aparelho de Clevenger modificado. As folhas de plantas de cada tratamento foram coletadas e levadas ao Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais /UERN, onde foram pesadas e colocadas em balão de fundo redondo com capacidade para 2 L, contendo água destilada. A extração foi realizada por um período de 2 horas, controlando-se a temperatura para aproximadamente 100 °C. A partir da massa obtida na extração e da massa úmida do material vegetal, os rendimentos dos óleos essenciais extraídos foram calculados e expressos em % (p/p). A equação utilizada para o cálculo da extração do óleo foi:  $M (\text{óleo}) / M (\text{folhas}) \times 100$ , onde M corresponde a massa. Foram utilizadas 4 amostras de cada tratamento, onde cada amostra representava uma repetição do tratamento. O delineamento experimental foi inteiramente

casualizado (DIC) e os tratamentos avaliados foram: T<sub>1</sub>: *L. gracilis* sem o inóculo de *M. cannonballus* e T<sub>2</sub>: *L. gracilis* com o inóculo de *M. cannonballus*. As amostras foram submetidas à análise de variância e as médias comparadas pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de significância pelo software ESTAT<sup>®</sup>.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Análise de sanidade nas raízes de *Lippia gracilis* Schauer e *Cucumis melo*.

No tocante à análise de sanidade, as raízes analisadas não apresentaram peritécios. Entretanto, após o isolamento de fragmentos de raízes de ambas as espécies, verificou-se a presença do fungo em 37,5% das amostras de *C. melo*. Na planta da qual a raiz foi isolada, os sintomas da doença se expressaram através de tombamento, folhas secas e raízes com amarelecimento. Tal sintomatologia é compatível com a observada por Martyn e Miller (1996), os quais definiram como o início dos sintomas da doença por *M. cannonballus* a presença do amarelecimento gradual da raiz e seca das folhas mais velhas, avançando rapidamente para as folhas mais jovens. A ausência de peritécios observada nesse trabalho, provavelmente se deve ao fato de o fungo encontrar-se no início do seu crescimento pois, segundo Mertely et al. (1991) e Sales Jr. et al. (2002), os peritécios só aparecem no ciclo final da doença nos tecidos das raízes apodrecidas, após o tombamento e murcha da planta.

Embora a espécie *C. melo* seja hospedeira de *M. cannonballus*, neste trabalho, menos de 40% das plantas mostraram infecção, tal fato pode estar relacionado com o potencial do inóculo nas raízes de *C. melo*. É importante salientar que a esterilização do solo por autoclavagem pode ter causado perdas da microbiota natural do mesmo, o que pode ter prejudicado a infectividade do inóculo. Esse fato também foi observado por Medeiros (2008), o qual afirma que pode ocorrer pouca germinação dos ascósporos na rizosfera de melão cujo desenvolvimento se deu em solo anteriormente autoclavado, prejudicando o procedimento da inoculação deste patógeno. Segundo Mertely et al. (1993), a densidade de inóculo é apenas um dos componentes do seu potencial de infectividade, o qual também interfere na viabilidade e na infectividade dos ascósporos. Portanto, existem muitas influências sobre o potencial de inóculo que podem resultar na ausência de correlação entre densidade populacional de *M. cannonballus* no solo e a susceptibilidade da espécie à sua infecção (STANGHELLINI et al., 2004). Provavelmente, os exsudados da planta atuando isoladamente não estimularam a germinação de *M. cannonballus*, podendo haver a necessidade da participação da microflora do solo neste processo. Stanguellini et al. (2000), verificaram que os actinomicetos e bactérias Gram-positivas

estão envolvidos, de forma direta ou indireta, na indução da germinação de ascósporos, na presença de exsudados de raízes de plantas de melão.

Já para o tratamento envolvendo a espécie *L. gracilis*, observou-se a ausência de sinais do patógeno, não havendo, portanto, isolamento de *M. cannonballus* nas placas onde foram feitas a inoculação dos fragmentos de suas raízes. Tal fato presume uma provável resistência da espécie *L. gracilis* frente ao fungo *M. cannonballus*, uma vez que a espécie possui atividade antimicrobiana comprovada (ALBUQUERQUE et al., 2006; CAVALCANTI et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2008; VIANA, 2010). Provavelmente, os exsudatos radiculares produzidos por *L. gracilis* tenham inibido o fungo, impedindo o seu crescimento e isso pode explicar porque o fungo não apareceu no teste de isolamento das raízes em placa de Petri. A planta hospedeira também exerce influência sobre a infectividade dos ascósporos de *M. cannonballus*, pela qualidade e quantidade de exsudatos radiculares estimulantes liberados, que podem ser de natureza fungitóxica (PIVONIA et al., 1997). Similarmente, Agrios et al, (2004), estudando a antracnose da cebola, causada pelo fungo *Colletotrichum circinans*, observaram que variedades resistentes geralmente têm compostos fenólicos, ácido protocatéuico e catecol, que promovem a inibição do fungo.

Espécies ou variedades de plantas que, por alguma razão, não produzem uma das substâncias essenciais para a sobrevivência de um patógeno obrigatório ou para o desenvolvimento de infecção por algum parasita, serão resistentes ao patógeno que necessite desta substância (AGRIOS, 2004). Talvez, devido a esse fato *L. gracilis* tenha se mostrado resistente ao *M. cannonballus*. Outra explicação também pode estar relacionada com a concentração do inóculo, que foi a mesma utilizada para *C. mel*. Segundo a literatura, a concentração de 20 u.f.c.g<sup>-1</sup> de solo é apropriada para estudos de virulência de *M. cannonballus* em *C. melo* (ANDRADE et al, 2005). Como o presente trabalho é pioneiro, não existem na literatura referências acerca da concentração ideal de inóculo capaz de causar infecção em *L. gracilis*.

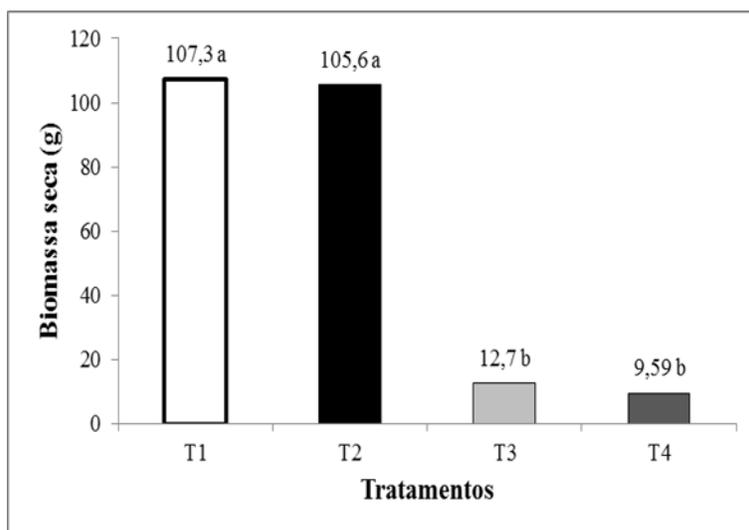
#### 4.2 Efeito do estresse biótico sobre o crescimento de *L. gracilis* e *C. melo*

Os dados referentes à biomassa seca de parte aérea e de raízes de *L. gracilis* e *C. melo* estão apresentados na Figura 3 e 4. Em se tratando da influência do estresse biótico no crescimento de *L. gracilis*, foi possível verificar que, para a biomassa seca de parte aérea de *L. gracilis*, os dados mostram que não houve diferença estatística entre as plantas inoculadas e as não inoculadas (Fig. 3). Entretanto, o gráfico mostra diferença estatística entre *L. gracilis* e *C. melo*. Fica evidente essa constatação, em virtude de se tratarem de espécies diferentes, onde *L. gracilis* possui porte subarbustivo (MARRETO et al., 2008) e *C. melo* possui porte herbáceo, com caule de crescimento rasteiro ou prostrado (FONTES; PUIATTI, 2005).

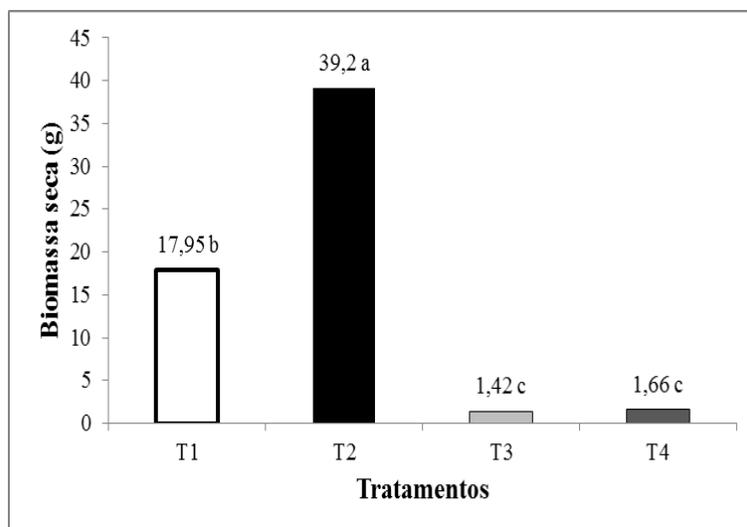
Já para a parte radicular de *L. gracilis*, houve um incremento significativo de biomassa seca da raiz de *L. gracilis* (Fig. 4). Provavelmente o fungo *M. cannonballus* tenha estimulado o desenvolvimento de raízes secundárias, uma vez que o fungo bloqueia a absorção de água, prejudicando o status hídrico da planta (SALES JR et al., 2003). De acordo com Soares e Machado (2007), as plantas conseguem modular respostas de defesa de forma a superar os estresses e retornar ao metabolismo normal. Segundo Taiz e Zeiger (2009), o aumento da biomassa da raiz é uma das respostas da planta ao estresse, seja ele biótico ou abiótico. Resultados contrários foram detectados por Ulbrecht e Bownman, (2004), os quais verificaram redução das raízes de citros inoculadas com *P. nicotianae* e *Phytophthora palmivora* e Martinez et al (2010), que estudando o efeito da infecção do fungo *Bipolaris maydis* em *Panicum maximum* também verificaram que o fungo reduz a biomassa seca dessas plantas, influenciando negativamente o seu crescimento. Ficou comprovado que vários parâmetros morfológicos e fisiológicos podem ser alterados na interação planta-patógeno, como massa seca, fenologia (SADRAS et al., 2000), crescimento e área foliar das plantas (MORIONDO et al., 2005).

Já para a espécie *C. melo*, os resultados mostraram que não houve diferença estatística na biomassa seca de parte aérea (Fig. 3) e de raízes (Fig. 4) entre as espécies com e sem o inóculo de *M. cannonballus*. Sabe-se que *C. melo* é susceptível ao *M. cannonballus*, no entanto, a sintomatologia característica desse fungo não foi observada na maioria das plantas. Portanto, acredita-se que os sintomas não tenham se manifestado pelo fato da infecção pelo fungo estar na fase inicial. De acordo com Andrade et al (2005), as raízes secundárias da planta apresentam-se necrosadas e apodrecidas ocorrendo, posteriormente o desaparecimento do córtex,

fazendo com que haja perda do sistema radicular nos últimos estágios da doença. A mesma afirmação foi feita por Aegerter et al., (2000), os quais verificaram que *M. cannonballus* reduz o comprimento da raiz em até 93%, no ciclo final da doença e, desta forma, como não são supridas as necessidades hídricas da cultura, ocorre também a murcha generalizada e diminuição da parte aérea em *C. melo*.



**Figura 3 - Biomassa seca (g) da parte aérea de *L. gracilis* e *C. melo* sob condições de estresse biótico com *M. cannonballus*.** T<sub>1</sub> - (*L. gracilis* sem o inóculo de *M. cannonballus*), T<sub>2</sub> - (*L. gracilis* com o inóculo de *M. cannonballus*), T<sub>3</sub> - (*C. melo* sem o inóculo de *M. cannonballus*) e T<sub>4</sub> - (*C. melo* com o inóculo de *M. cannonballus*). UERN, Mossoró, RN, 2013. Letras minúsculas iguais no mesmo tratamento e maiúsculas entre os diferentes tratamentos não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. CV% = 16.46.



**Figura 4 - Biomassa seca (g) de raiz de plantas de *L. gracilis* e *C. melo* sob condições de estresse biótico com *M. cannonballus*.** T<sub>1</sub> - (*L. gracilis* sem o inóculo de *M. cannonballus*), T<sub>2</sub> - (*L. gracilis* com o inóculo de *M. cannonballus*), T<sub>3</sub> - (*C. melo* sem o inóculo de *M. cannonballus*) e T<sub>4</sub> - (*C. melo* com o inóculo de *M. cannonballus*). UERN, Mossoró, RN, 2013. Letras minúsculas iguais no mesmo tratamento e maiúsculas entre os diferentes tratamentos não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. CV% = 11,35.

#### 4.3 Teores de carboidratos, clorofila e proteínas totais em *L. gracilis* e *C. melo*

Os dados de carboidratos, clorofila e proteínas totais encontram-se na Tabela 1. As plantas de *L. gracilis* inoculadas com o fungo apresentaram uma maior quantidade de carboidratos quando comparadas com as não inoculadas e, para a espécie *C. melo* não houve diferença estatística entre as plantas inoculadas e as não inoculadas (Tab. 1). Resultados iguais foram encontrados por Silveira (2008) que, embora trabalhando com plantas de *C. melo* inoculadas com fungos micorrízicos arbusculares sob estresse salino, encontrou um aumento nos teores de carboidratos nas plantas inoculadas em relação às plantas não inoculadas.

Esse aumento dos carboidratos em *L. gracilis* pode ser explicado pelo fato de que provavelmente o fungo, caracterizado como um patógeno radicular, esteja inibindo o transporte de açúcar no floema da raiz, acarretando o acúmulo deste nas folhas e restringindo o transporte da seiva elaborada da copa para o sistema radicular. Resultados semelhantes foram encontrados por Maust et al (2003), trabalhando com coqueiros (*Cocos nucifera*) infectados por um fitoplasma, causador do amarelecimento letal nessa espécie. Esses pesquisadores sugerem que uma maior concentração de carboidratos em folhas provavelmente deve-se à inibição do transporte de açúcar no floema para a raiz. Além disso, Lobato et al (2009), ao estudarem o efeito da infecção

de cultivares de *Phaseolus vulgaris* pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum*, também verificaram um aumento no teor total de hidrato de carbono solúvel nas plantas infectadas pelo agente patogênico, o que também foi observado por Arias et al. (2003), que encontraram resultados semelhantes em girassol (*Helianthus annuus* L.). Diferentemente, Beltrame (2010), estudando a interação do fungo *Phytophthora nicotianae* em *Citrumelo swingle*, observou que o patógeno não causou alterações no teor de açúcares nas folhas dessa espécie.

Em relação aos teores de proteínas totais, para a espécie *L. gracilis*, as plantas que foram inoculadas apresentaram aumento significativo quando comparadas com as testemunhas e, para a espécie *C. melo*, não foram encontrados resultados significativos. Essa constatação encontra respaldo na Literatura, pois, em geral, plantas infectadas por fitopatógenos sofrem um aumento considerável quanto ao conteúdo de proteínas e esse aumento pode ser explicado como sendo proveniente da ação conjunta dos organismos envolvidos na ação patógeno-hospedeiro, pois a planta de um lado, procura ativar seus mecanismos de defesa para evitar o estabelecimento de relações parasitárias e o patógeno, por outro lado, tenta anular o efeito inibitório gerado pela planta. As proteínas produzidas mediante mecanismos de defesa podem ser estruturais ou relacionadas à patogênese (STANGARLIN; PASCHOLATE, 2000). Incrementos na produção de proteínas já foram relatados por autores como Albrecht e Browman (2007), em plantas de citros inoculadas com *P. palmivora*. Por outro lado, em avaliações realizadas em tecidos de folhas de tangerina inoculadas com *P. nicotianae* não foi possível observar alterações nas proteínas. (BELTRAME, 2010).

Para os teores de clorofila total, não houve diferenças significativas em relação às plantas inoculadas e as não inoculadas para *L. gracilis* e *C. melo* (Tabela 01). Embora as alterações na taxa fotossintética não tenham sido estudadas neste trabalho, pode-se inferir que, como não houve alteração nos teores de clorofila total, também não houve interferência nos níveis de fotossíntese e na fisiologia da planta. Assim, para uma melhor compreensão do comportamento fotossintético de plantas de *L. gracilis* e *C. melo* infectadas por *M. cannonballus*, seria necessário abordar outros fatores, como disponibilidade de CO<sub>2</sub>, condutância estomatal e alteração de outros pigmentos fotossintéticos.

**Tabela 1. Teores de carboidratos, clorofila e proteínas totais em *L. gracilis* e *C. melo*.**

Tratamentos	Carboidratos $\mu\text{g. mL}^{-1}$	Clorofila $\text{mg. mL}^{-1}$	Proteínas Totais $\mu\text{g. mL}^{-1}$
T <sub>1</sub>	32.11 b	0.354 a	0.335 b
T <sub>2</sub>	64.93 a	0.387 a	0.605 a
T <sub>3</sub>	32.81 b	0.285 a	0.340 b
T <sub>4</sub>	39.92 b	0.284 a	0.327 b
CV%	14,06	15,11	10,48

T<sub>1</sub> (*L. gracilis* sem o inóculo de *M. cannonballus*), T<sub>2</sub> (*L. gracilis* com o inóculo de *M. cannonballus*) T<sub>3</sub> (*C. melo* sem o inóculo de *M. cannonballus*), T<sub>4</sub> (*C. melo* com o inóculo de *M. cannonballus*). UERN, Mossoró, RN, 2014.

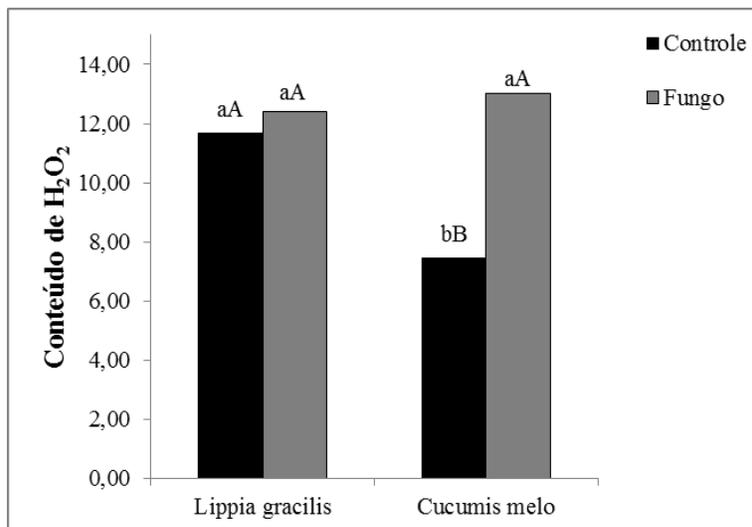
Letras maiúsculas iguais nas barras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

#### 4.4 Estresse biótico e o seu efeito no Sistema Antioxidativo de *L. gracilis* e *C. melo*

Os resultados da análise das enzimas revelou que as espécies avaliadas ativaram de forma diferenciada os seus sistemas de defesa através do sistema antioxidativo. Para o tipo de estresse a que fora submetida, a espécie *L. gracilis* apresentou um sistema antioxidativo muito eficiente, contrastando com a espécie *C. melo*, para a qual os dados sugerem um verdadeiro colapso das enzimas, as quais não conseguiram modular o estresse causado pelo fungo.

O ponto de partida para essa constatação refere-se aos dados relacionados com o conteúdo de Peróxido de Hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) nas duas espécies (Figura 5), os quais não foram significativos para a espécie *L. gracilis*, onde o tratamento com fungo se assemelhou estatisticamente ao tratamento sem fungo. Entretanto, para a espécie *C. melo*, observou-se diferença estatística para o tratamento com fungo, indicando um maior acúmulo desse radical no referido tratamento. A importância da quantificação de  $\text{H}_2\text{O}_2$  é evidenciada porque o mesmo é um oxidante relativamente estável e pode iniciar o dano oxidativo nas células levando à interrupção da função metabólica e perda da integridade celular, resultando em senescência (SRIVASTAVA, 2000). A geração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  é aumentada em resposta a diferentes condições de estresse, que geralmente desencadeiam a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), como o superóxido  $\text{O}^{\cdot -}$ , por exemplo. Apesar de ser um composto danoso quando acumulado na célula, o  $\text{H}_2\text{O}_2$  também desempenha um papel importante no processo de aclimação e tolerância cruzada. Isso quer dizer que quando a planta é exposta previamente a um determinado estresse

pode induzir tolerância a subsequentes exposições ao mesmo estresse ou a outro tipo diferente deste (NEILL et al., 2002).

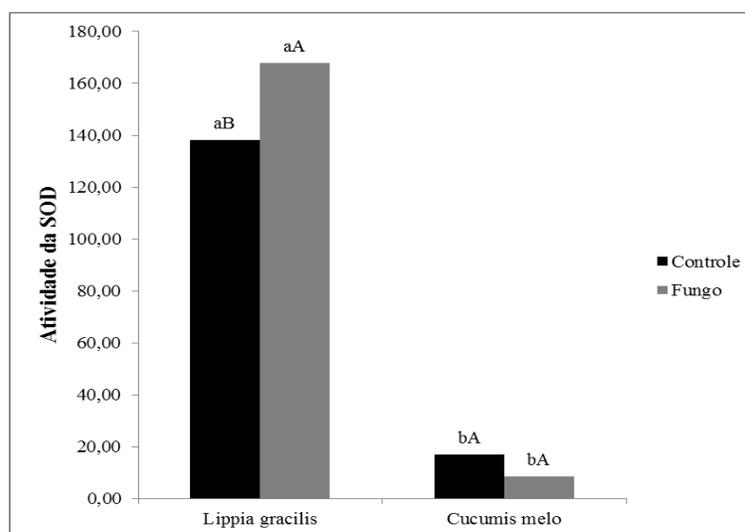


**Figura 5 – Quantificação do conteúdo de Peróxido de  $H_2O_2$  ( $\mu\text{mol/g MF}$ ) em *L. gracilis* e *C. melo*.** *Lippia gracilis* (*L. gracilis* sem o inóculo de *M. cannonballus* – cor preta, controle e *L. gracilis* com o inóculo de *M. cannonballus* – cor cinza, fungo). *Cucumis melo* (*C. melo* sem o inóculo de *M. cannonballus*, cor preta, controle e *C. melo* com o inóculo de *M. cannonballus* – cor cinza, fungo). Letras minúsculas iguais no mesmo tratamento e maiúsculas entre os diferentes tratamentos não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Os dados apresentados na Figura 5 são compatíveis com os referentes à atividade da SOD (Figura 6). Na espécie *L. gracilis*, os dados revelaram a atividade dessa enzima no tratamento com fungo, o qual se diferenciou estatisticamente do tratamento sem fungo. Provavelmente o estresse provocado pelo ataque fúngico gerou o radical superóxido ( $O^{\cdot -}$ ) e esse fato explica o aumento na atividade da SOD, que tem como uma de suas atribuições dismutar o  $O^{\cdot -}$  a  $H_2O_2$  (ALSCHER et al., 2002; APEL; HIRT, 2004; PRASAD, 2004; SANKAR et al., 2007; BHATTACHARJEE, 2010). Devido a esse fato, a SOD é considerada uma enzima chave envolvida na detecção de estresse (GRATÃO et al. 2005; DUBEY, 2010; DINAKAR, et al., 2012).

No tocante à espécie *C. melo*, os dados revelaram uma baixa atividade da SOD (Figura 6), porém isso não quer dizer que não houve atividade da enzima, uma vez que observou-se um aumento do conteúdo de  $H_2O_2$  para essa espécie (Figura 5). Provavelmente, em virtude do alto estresse sofrido pela planta, a demanda de radicais superóxido a serem

dismutados foi muito alta e o aumento do conteúdo de  $H_2O_2$  promoveu o colapso dessa enzima, uma vez que altos níveis de  $H_2O_2$  podem danificar organelas e também inativar a SOD (HALLIWELL, 1974; FOYER e NOCTOR, 2003). Esses resultados também concordam com Moraes (2013), que ao trabalhar com estresse hídrico em variedades de cana-de açúcar, também ressaltou a inativação da SOD em detrimento do alto conteúdo de  $H_2O_2$ . Também foram relatados aumentos da atividade da SOD como resposta a várias situações de estresse, a exemplo do feijão caupi atacado pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum* (BARRETO, 2005) e em trigo infectado por *Puccinia recondita* (IVANOV et al., 2004).

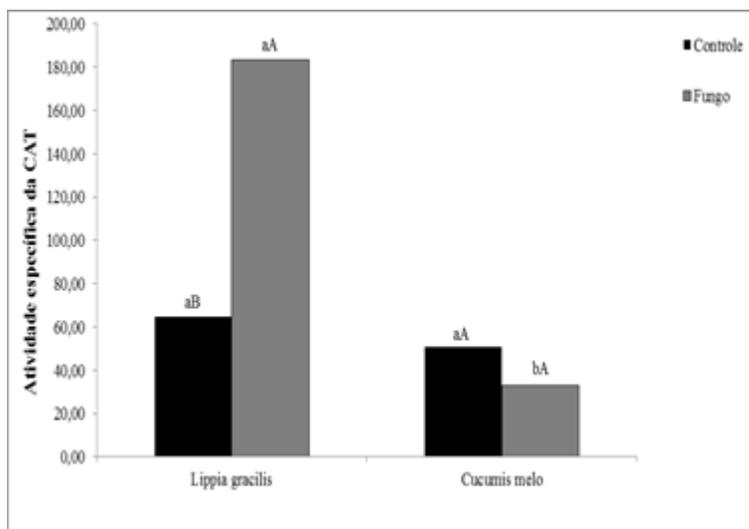


**Figura 6 – Atividade da SOD (U SOD mg prot.-1) em *L. gracilis* e *C. melo* sob estresse biótico.** *Lippia gracilis* (*L. gracilis* sem o inóculo de *M. cannonballus* – cor preta, controle e *L. gracilis* com o inóculo de *M. cannonballus* – cor cinza, fungo). *Cucumis melo* (*C. melo* sem o inóculo de *M. cannonballus*, cor preta, controle e *C. melo* com o inóculo de *M. cannonballus* – cor cinza, fungo). Letras minúsculas iguais no mesmo tratamento e maiúsculas entre os diferentes tratamentos não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

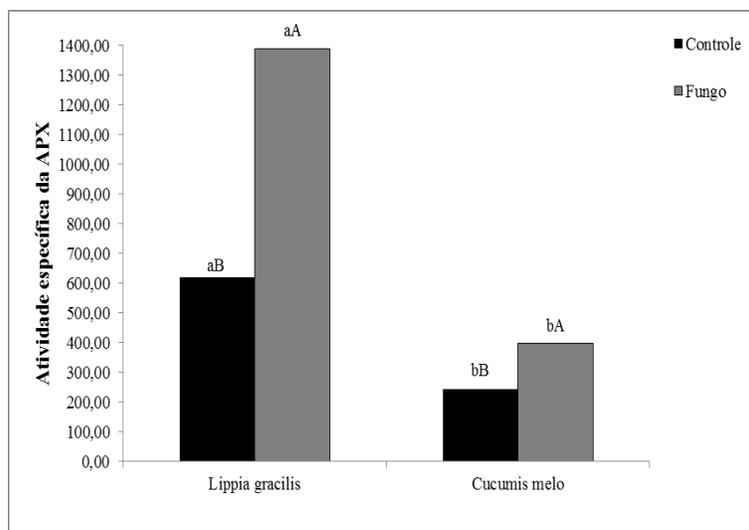
No tocante a atividade das enzimas CAT e APX (Figuras 7 e 8), os dados mostram que, para a espécie *L. gracilis*, houve uma alta atividade dessas enzimas no tratamento com o fungo *M. cannonballus*. Esse resultado explica o motivo pelo qual não houve diferença estatística nos níveis de  $H_2O_2$  para a espécie *L. gracilis* com a presença do fungo, visto que as CAT e APX atuam convertendo o  $H_2O_2$  à água e oxigênio molecular. A CAT tem uma baixa afinidade pelo  $H_2O_2$  requerendo a ligação de duas moléculas dessa ROS para que a reação ocorra e, dessa forma, as CAT seriam responsáveis pela remoção do excesso de  $H_2O_2$  durante o estresse

(MITTLER, 2002; GECHEV et al., 2006; DUBEY, 2010). Estas enzimas possuem diferentes afinidades por essa ROS, em que a APX teria alta afinidade ( $\mu\text{M}$ ) e a CAT baixa afinidade ( $\text{mM}$ ) (MITTLER, 2002). Portanto, as APX seriam responsáveis pela modulação final dessas ROS, podendo eliminar  $\text{H}_2\text{O}_2$  que estão inacessíveis à CAT, no caso dos cloroplastos (FOYER e NOCTOR, 2011). Assim, a remoção completa foi realizada pela APX (Figura 07), que é considerada a enzima mais importante na eliminação do  $\text{H}_2\text{O}_2$  de certos compartimentos celulares onde não existem catalases para atuar nessa função (MITTLER, 2002). Desta forma, é importante ressaltar a ação combinada dessas enzimas na espécie *L. gracilis*, que juntamente com a SOD, promoveram a eliminação do  $\text{H}_2\text{O}_2$ , uma vez que a SOD gerou o  $\text{H}_2\text{O}_2$  e as enzimas CAT e APX o removeram prontamente. Ademais, é indiscutível a importância das enzimas CAT e APX na célula vegetal, pois sua atividade é fundamental para a manutenção do equilíbrio redox, conforme fora observado também por outros autores (NAYYAR; GUPTA, 2006; WANG et al. 2003; CIA, 2010).

Já para a espécie *C. melo*, os dados mostram valores baixos de CAT e APX, não havendo diferença estatística entre os tratamentos com e sem fungo (Figuras 7 e 8). Provavelmente, o acúmulo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  contribuiu ativamente na perturbação do sistema redox e isso justifica a insuficiente atividade enzimática (FOYER; NOCTOR, 2003). Em outras palavras, parece ter ocorrido um colapso no sistema antioxidativo da espécie *C. melo* durante o estresse causado pelo fungo, resultando na baixa atividade da CAT e da APX.



**Figura 7 – Atividade da CAT ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína) em *L. gracilis* e *C. melo* sob estresse biótico. *Lippia gracilis* (*L. gracilis* sem o inóculo de *M. cannonballus* – cor preta, controle e *L. gracilis* com o inóculo de *M. cannonballus* – cor cinza, fungo). *Cucumis melo* (*C. melo* sem o inóculo de *M. cannonballus* - cor preta, controle e *C. melo* com o inóculo de *M. cannonballus* – cor cinza, fungo). Letras minúsculas iguais no mesmo tratamento e maiúsculas entre os diferentes tratamentos não diferem entre si pelo teste de ao nível de 5% de probabilidade).**



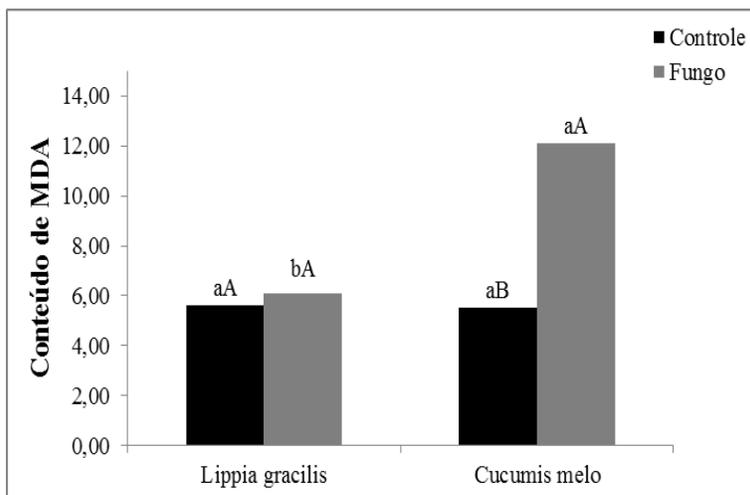
**Figura 8 – Atividade da APX ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína) em *L. gracilis* e *C. melo*. *Lippia gracilis* (*L. gracilis* sem o inóculo de *M. cannonballus* – cor preta e *L. gracilis* com o inóculo de *M. cannonballus* – cor cinza). *Cucumis melo* (*C. melo* sem o inóculo de *M. cannonballus* - cor preta e *C. melo* com o inóculo de *M. cannonballus* – cor cinza). Letras minúsculas iguais no mesmo tratamento e maiúsculas entre os diferentes tratamentos não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.**

Com relação ao conteúdo de Malondialdeído (MDA), observaram-se baixos níveis desse composto na espécie *L. gracilis* inoculadas com o fungo, não havendo diferença significativa em relação ao controle (Figura 9). Ao contrário do que foi observado para *L. gracilis*, o nível de MDA nas plantas de melão submetidas ao estresse foi superior ao quantificado no tratamento controle. Esses resultados estão em consonância com a resposta da atividade das enzimas do sistema antioxidativo. Para *L. gracilis* verificou-se altas concentrações de SOD, CAT e APX (Figuras 6, 7 e 8) as quais foram responsáveis pelo baixo conteúdo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 5) e de MDA (Figura 9). Sob condições de estresse a atividade destas enzimas é aumentada resultando em reduzido conteúdo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e MDA (DELLABIGLIA et al. 2010). Esses resultados também foram encontrados por Morais (2013), trabalhando com estresse múltiplo em cana de açúcar. Já para a espécie *C. melo*, a baixa atividade da SOD, CAT e APX, resultaram no aumento do conteúdo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e de MDA, que foram gerados pelo estresse. Nesse caso, observou-se peroxidação lipídica nessa espécie, visto que o conteúdo de MDA estava elevado e a inibição da maquinaria antioxidante pode também levar ao acúmulo de ROS que causam a peroxidação de lipídeos (TORRES, 2010).

Na literatura são escassos os relatos de trabalhos envolvendo a interação entre fungos patogênicos e plantas medicinais. Assim, tornou-se necessário, a efeitos comparativos, mencionar pesquisas realizadas com espécies agrícolas expostas as mais diversas condições geradoras de estresses. Foram observados que a infecção por *C. gloeosporioides* causou aumento da atividade de enzimas antioxidantes nos clones de seringueira analisados, evidenciando que o agente biótico aplicado inicia uma resposta de maneira universal. A tendência ao aumento destas enzimas antioxidantes nas plantas de seringueira indica que existem mecanismos ativados para defesa frente a EROs geradas pela presença do fungo. A ação combinada do déficit hídrico e elevadas temperaturas resultou em maiores danos a plantas de *Jatropha curcas* do que o estresse por temperatura isoladamente. Essas plantas exibiram uma elevada atividade das enzimas CAT, APX e SOD e apresentaram um balanço redox favorável entre a forma reduzida e oxidada do ascorbato quando o estresse foi induzido apenas pela elevação de temperatura (SILVA et al., 2010).

Diante do exposto, as respostas bioquímicas de defesa de *L. gracilis* devem ser detalhadamente estudadas para a melhor compreensão das estratégias de defesa empregadas pela

planta. Tal estudo é importante por possibilitar o desenvolvimento de variedades mais aptas a se defenderem das pressões bióticas que lhes são impostas nos ambientes onde são cultivadas.



**Figura 9 – Peroxidação lipídica através da quantificação da Malondialdeído – MDA ( $\mu\text{mol/g MF}$ ) em *L. gracilis* e *C. melo*. *Lippia gracilis* (*L. gracilis* sem o inóculo de *M. cannonballus* – cor preta, controle e *L. gracilis* com o inóculo de *M. cannonballus* – cor cinza, fungo). *Cucumis melo* (*C. melo* sem o inóculo de *M. cannonballus* - cor preta, controle e *C. melo* com o inóculo de *M. cannonballus* – cor cinza, fungo). Letras minúsculas iguais no mesmo tratamento e maiúsculas entre os diferentes tratamentos não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade**

#### **4.5 Efeito do óleo essencial e dos extratos foliar e radicular de *L. gracilis* na inibição do crescimento micelial *in vitro* de *M. cannonballus***

Os dados referentes à percentagem de inibição do crescimento micelial do fungo *M. cannonballus* frente aos tratamentos envolvendo o óleo essencial e os extratos vegetais de *L. gracilis*, bem como a visualização dessa inibição em placas de Petri estão apresentados na Figura 10, 11 e 12. Nos trabalhos *in vitro*, o óleo essencial em todas as concentrações avaliadas e os extratos foliar (7500 ppm) e radicular (5000 e 7500 ppm) inibiram 100% do crescimento micelial do fungo (Fig. 10). A inibição fúngica incitada por esses extratos naturais não diferiram estatisticamente do controle positivo (com fungicida comercial Captan<sup>®</sup>), porém quando comparados ao controle negativo (apenas meio de cultura) observou-se diferença significativa (Fig. 10). Sem dúvida alguma, os dados revelaram que o óleo essencial é mais eficiente quando

comparado aos extratos, pois doses consideravelmente mais baixas já inibem 100% do crescimento fúngico. Existem relatos na literatura acerca da atividade antimicrobiana do óleo essencial de *L. gracilis* (ALBUQUERQUE et al., 2006; CAVALCANTI et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2008; VIANA, 2010), porém ainda não há dados publicados a respeito dessa atividade, dos extratos radiculares e foliares dessa espécie.

A ação biológica do óleo contra os micro-organismos se dá em virtude da presença de dois monoterpenos fenólicos, o carvacrol e o timol, os quais são os compostos majoritários nessa espécie e possivelmente os responsáveis pela potente atividade antimicrobiana, a qual pode ser superior à de fármacos utilizados em protocolos *in vitro* (FONTENELLE et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2007; NOGUEIRA et al., 2007; SARRAZIN et al., 2012; ZARE et al., 2012; GOMES et al., 2011). O mecanismo de ação desses monoterpenos voláteis nas células dos microrganismos já é bem conhecido (LAMBERT et al., 2001; BURT, 2004), pois, em virtude da natureza lipofílica do óleo, há forte interação deste com a membrana plasmática da célula, interferindo na sua permeabilidade e causando alterações em sua estrutura, onde o resultado é a formação de canais, através dos quais há extravasamento de conteúdo e consequente desorganização celular (COSTA et al., 2011).

Outras espécies do gênero *Lippia* também apresentaram potente atividade antimicrobiana, a exemplo do trabalho de Silva et al (2013), os quais verificaram que os óleos essenciais de *L. gracilis* e *Lippia sidoides*, também proporcionaram forte inibição *in vitro* do fungo *Rhizoctonia solani*, um importante fitopatógeno habitante do solo que, assim como *M. cannonballus*, causa tombamento e, conseqüentemente perdas em diversas culturas de importância econômica (FALTIN, et al., 2004). Além dessas espécies, o óleo essencial de *Lippia scaberrina* reduziu em até 86% o crescimento micelial de *Botryosphaeria parva* (REGNIER et al., 2008).

Nesse estudo, a dose de 2500 ppm tanto do extrato radicular quando foliar não foram eficientes no controle do crescimento micelial, pois proporcionaram apenas 45,47 e 38,19% de inibição respectivamente. A atividade antifúngica do extrato radicular foi mais eficiente quando comparada ao foliar, pois doses de 5000 ppm já foram suficientes para inibir 100% do crescimento micelial, enquanto que nessa mesma concentração do extrato foliar, o fungo cresceu 32,04% (Fig. 10).

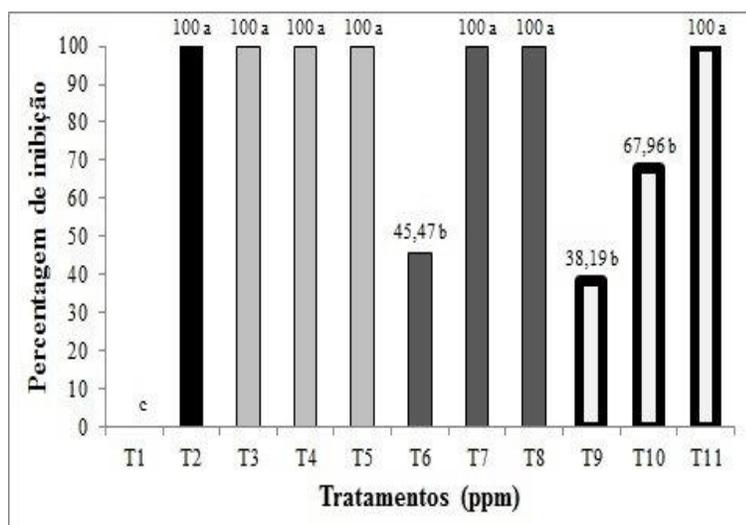
A superioridade da eficiência do óleo essencial frente aos extratos, principalmente o foliar, deve-se provavelmente ao fato de que os compostos antifúngicos sintetizados pela planta se concentram mais no óleo essencial, sendo detectados em menores concentrações nos extratos ou então, os mesmos podem apresentar compostos voláteis hidrossolúveis. (FRANZENER et al., 2007). Além disso, essa redução na capacidade de inibição dos extratos de *L. gracilis* pode ser atribuída também a uma provável volatilização dos constituintes químicos dos extratos ou à instabilidade dos mesmos, quando na presença de luz, calor, ar e umidade no interior das placas de Petri (SIMÕES e SPITZER, 2000). Por fim, a forma de esterilização, a metodologia adotada e o tempo de armazenamento do extrato podem ter interferido na sua atividade em relação ao desenvolvimento micelial de *M. cannonballus*, como fora observado por Leme et al (2007), ao estudarem a ação do extrato de capim-limão sobre o fungo *Colletotrichum acutatum*.

Observou-se uma correlação positiva entre a dose dos extratos e o percentual de inibição (Fig. 10). Resultados semelhantes foram encontrados por Mota et al., (2012) que trabalhando com o extrato de folhas de *Lippia sidoides*, observaram que o efeito inibidor do extrato foliar aumentou à medida que se elevou a dose do produto. Outro aspecto importante diz respeito à presença de saponinas no extrato radicular de *L. gracilis*, estando amplamente relacionadas com a defesa da planta para neutralizar agentes patogênicos (VAN DYCK et al., 2010). Provavelmente, a presença de saponinas nas raízes de *L. gracilis* tenha neutralizado o crescimento micelial de *M. cannonballus*, uma vez que vários trabalhos corroboram com este resultado, evidenciando a sua atividade fungicida (HOWE e JANDER, 2008; COLEMAN et al., 2010; DE LEO et al., 2006; SAHA et al., 2010; SUNG e LEE, 2008, LANZOTTI et al., 2012). O mecanismo de ação das saponinas é semelhante ao do óleo, pois de acordo com Barile et al. (2006), os compostos presentes nestes formam complexos com esteróis, resultando num aumento da permeabilidade da membrana do fungo e vazamento do conteúdo de suas células.

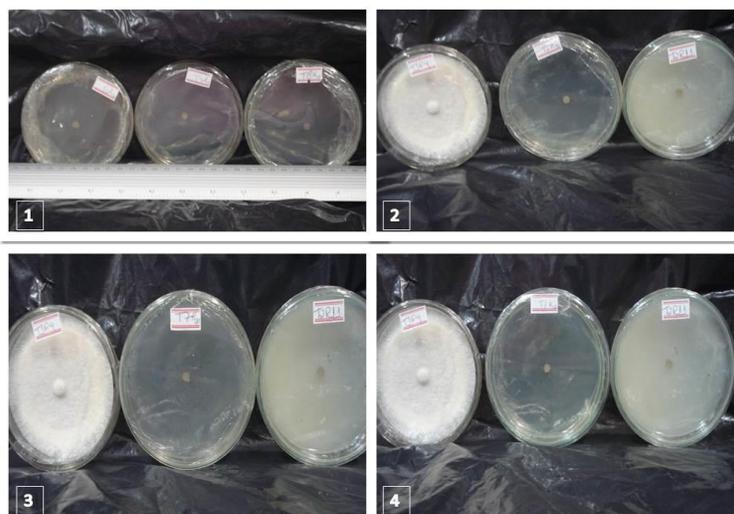
Trabalhos ressaltando a ação biológica de extratos de plantas têm sido apontados como eficientes no controle de doenças fúngicas. Tagami et al (2009), estudando a fungitoxidade de extratos brutos de erva cidreira no desenvolvimento *in vitro* de fungos, demonstraram que os extratos testados apresentaram ação fungitóxicas sobre o crescimento micelial do fungo *Colletotrichum graminicola*. Diversos outros fungos foram inibidos por extratos etanólicos de *Cassia alata* (MAKINDE et al., 2007) e *Senna alata* (MEDEIROS et al., 2011.; MEDEIROS et al., 2012), inclusive o *M. cannonballus* (VIANA et al., 2008). Resultados positivos também

foram detectados contra as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumonia* utilizando extrato aquoso de folhas de *L. alba* (SENA et al., 2006).

Pelo exposto, a verificação da eficiência do óleo essencial e do extrato radicular de *L. gracilis* frente ao fungo *M. cannonballus* abre novas possibilidades para a indústria química no sentido de lançar no mercado novos produtos químicos de origem vegetal a fim de controlar fungos fitopatogênicos e que sejam menos danosos ao meio ambiente.



**Figura 10. Percentagem de inibição do crescimento micelial *in vitro* de *M. cannonballus* pelo óleo essencial de *L. gracilis*.** Os tratamentos avaliados foram: T<sub>1</sub> (0 ppm), T<sub>2</sub> (Fungicida comercial Captan®), T<sub>3</sub> (Óleo essencial de *L. gracilis* na concentração de 0,3 ppm), T<sub>4</sub> (Óleo essencial de *L. gracilis* na concentração de 0,4 ppm), T<sub>5</sub> (Óleo essencial de *L. gracilis* na concentração de 0,5 ppm), T<sub>6</sub> (Extrato radicular de *L. gracilis* na concentração de 2,5 ppm), T<sub>7</sub> (Extrato radicular de *L. gracilis* na concentração de 5 ppm), T<sub>8</sub> (Extrato radicular de *L. gracilis* na concentração de 7,5 ppm), T<sub>9</sub> (Extrato foliar de *L. gracilis* na concentração de 2,5 ppm), T<sub>10</sub> (Extrato foliar de *L. gracilis* na concentração de 5,0 ppm), T<sub>11</sub> (Extrato foliar de *L. gracilis* na concentração de 7,5 ppm). UERN, Mossoró, RN, 2014. Letras minúsculas iguais nas barras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade. CV% = 8,43.



**Figura 11 – Inibição do crescimento micelial *in vitro* do fungo *M. cannonballus* pelo óleo essencial de *L. gracilis*.** (1) As concentrações avaliadas foram 0,3, 0,4 e 0,5 ppm; (2) Comparação entre o tratamento controle, o tratamento com 0,3 ppm do óleo essencial de *L. gracilis* e o tratamento com o fungicida comercial Captain; (3) Comparação entre o tratamento controle, o tratamento com 0,4 ppm do óleo essencial de *L. gracilis* e o tratamento com o fungicida comercial Captain; (4) Comparação entre o tratamento controle, o tratamento com 0,5 ppm do óleo essencial de *L. gracilis* e o tratamento com o fungicida comercial Captain. UERN, 2014.



**Figura 12 – Inibição do crescimento micelial *in vitro* de *M. cannonballus* pelos extratos foliar e radicular de *L. gracilis*.** **A:** T1 (controle), T7 (extrato radicular na concentração de 7,5 ppm e T2 (Fungicida comercial Captan<sup>®</sup>); **B:** (T1 (controle), T11 (extrato radicular na concentração de 7,5 ppm) e T2 (Fungicida comercial Captan<sup>®</sup>). UERN, 2014.

#### 4.6 Efeito do estresse biótico no rendimento do óleo essencial de *L. gracilis*

Nas condições deste experimento, não houve influência sobre o rendimento de óleo essencial em *L. gracilis*, em função do estresse causado por *M. cannonballus*. Assim, presume-se que esta espécie nativa da Caatinga tenha seu teor de óleo aumentado em função de outros aspectos como irradiância ou condições inóspitas, próprias deste ecossistema. Tais resultados corroboram com Ragagnin (2013), que avaliou o rendimento do óleo essencial de plantas de *L. gracilis*, sob estresse salino, não encontrando diferenças significativas entre os tratamentos avaliados. Além disso, Alvarenga et al., (2011), estudando o efeito do estresse hídrico antes da colheita de *Lippia sidoides*, verificaram que há diminuição do rendimento do óleo essencial e dos flavonóides totais até 50 e 60%, respectivamente. Também existem alguns trabalhos sobre influência de outros tipos de estresse no rendimento de óleo essencial para espécies de diferentes famílias. Assim, na avaliação do efeito do estresse hídrico de *Melaleuca alternifolia* Cheel sobre o crescimento, o teor e a constituição química do seu óleo essencial, Silva et al (2002), observaram que no tratamento com déficit hídrico houve diminuição no crescimento, na produção de biomassa fresca e seca das plantas e no teor de óleo essencial, mesmo quando comparado ao tratamento que recebia irrigação diária de 1 litro de água.

Provavelmente, em plantas do gênero *Lippia*, predomine a ação de fatores abióticos no rendimento e composição de óleos essenciais, a qual é influenciada pela sazonalidade (SILVA et al., 2006; NOGUEIRA et al., 2007; MORAIS, 2009), pela disponibilidade de água, luminosidade, temperatura, estágio de desenvolvimento da planta, bem como o seu estado nutricional. Além disso, a colheita e os procedimentos de pós-colheita influenciam, sobremaneira, na quantidade desses óleos essenciais. Bezerra et al. (2011) relataram que o horário de corte das folhas de *Lippia alba* influenciou no rendimento de óleo essencial, obtendo-se uma maior produção em amostra coletas ao meio-dia. Diferentemente, Ehlert et al., (2013) não observaram diferenças significativas na produção de massa foliar e produtividade de óleo essencial em massa fresca e seca de *L. alba* submetidas à diferentes horários de colheita. Os dados referentes ao rendimento do óleo essencial de *L. gracilis* sob estresse biótico encontram-se na Tabela 02.

**Tabela 02** Rendimento do óleo essencial de *L. gracilis* submetidas a estresse biótico por *M. cannonballus*

<b>Tratamentos</b>	<b>Rendimento % (p/p)</b>
<b>T<sub>1</sub></b>	<b>1,71 a</b>
<b>T<sub>2</sub></b>	<b>1,88 a</b>
<b>MG + DMS</b>	<b>1.79 + 0.50996</b>
<b>CV%</b>	<b>16.42</b>

Os tratamentos avaliados foram: **T<sub>1</sub>** (*L. gracilis* sem o inóculo de *M. cannonballus*) e **T<sub>2</sub>** (*L. gracilis* com o inóculo de *M. cannonballus*). Letras minúsculas iguais nas colunas não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de significância. UERN, 2014. MG: média geral; DMS: Diferença mínima significativa; CV% = Coeficiente de variação em %.

## 5 CONCLUSÕES

Nas condições do inóculo a que foram submetidas, raízes de *L. gracilis* e *C. melo* não apresentaram peritécios e o teste de reisolamento de *M. cannonballus* foi positivo para a espécie *C. melo*;

A análise de crescimento mostrou um aumento de biomassa seca da raiz de *L. gracilis* no tratamento com o inóculo do fungo, bem como um aumento nos teores de carboidratos e proteínas totais, os quais não foram significativos para a espécie *C. melo*;

O estresse biótico também induziu um aumento na atividade das enzimas SOD, CAT e APX que, em *L. gracilis*, foram eficientes no combate ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e a peroxidação. Já para a espécie *C. melo*, houve um incremento na MDA associado a uma menor atividade das enzimas, ocasionando um aumento da peroxidação lipídica e dos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>;

No tocante a atividade *in vitro* do óleo essencial e dos extratos etanólicos de raízes e folhas de *L. gracilis* sobre *M. cannonballus*, os dados mostram um percentual de inibição de 100% para o óleo essencial em todas as concentrações testadas, indicando a sua superioridade frente aos extratos de raízes e folhas de *L. gracilis*, os quais também inibiram *M. cannonballus*, nas concentrações de 5000 e 7500 ppm;

Quanto ao rendimento do óleo essencial de *L. gracilis* submetida ao estresse biótico por *M. cannonballus*, os dados mostraram que a produção de óleo essencial pelas plantas com o inóculo de *M. cannonballus* foi igual à produção das plantas sem o inóculo.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEGERTER, B. J., GORDON, T. R.; DAVIS R. M. Occurrence and pathogenicity of fungi associated with melon root rot and vine decline in California. **Plant Disease**, v. 84, p. 224-230, 2000.

AGRIOS, G. N. Plant Pathology. 5. Ed. San Diego, Califórnia: **Elsevier Academic Press**, 922p, 2004.

ALBRECHT, U., BOWMAN, K. D.; GRAHAM, J. H.; BRIGHT, D. B. Detection of *Phytophthora nicotianae* and *P. palmivora* in citrus roots using PCR-RFLP in comparison with other methods. **Eur. J. Plant Pathol.**, v. 119, p. 143-158, 2007.

ALBUQUERQUE, C. C.; CAMARA, T. R.; MARIANO, R. L. R.; WILLADINO, L.; MARCELINO JÚNIOR, C.; ULISSES, C. Antimicrobial Action of the Essential Oil of *Lippia gracilis* Schauer. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 49, n. 4, p. 527-535, 2006.

ALEXIEVA, V.; SERGIEV, I.; MAPELLI, S.; KARANOV, E. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. **Plant, Cell and Environment**, v. 24, p. 1337-1344, 2001.

ALSCHER, R. G.; ERTURK, N.; HEATH, L. S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 1331-1341, 2002.

ALVARENGA, I. C. A.; QUEIROZ, G. A., HONÓRIO, I. C. G.; VALADARES, R. V.; MARTINS, E. R. Free proline in *Lippia sidoides* Cham. under water stress before harvest. **Rev. bras. plantas med.**, v.13, n. spe, p. 539-541, 2011.

ANDRADE, D.E.G.T.; MICHEREFF, S. J.; BORGES, M.A.S.; ARAÚJO, I.B.; SALES JR, R. Influência da densidade de inóculo e de isolados de *Monosporascus cannonballus* na severidade do colapso do meloeiro. **Summa Phytopathologica**, v. 31, n. 2, p. 173-180, 2005.

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.

APEL, K., HIRT, H. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress and signal transduction. - **Annu Rev Plant Biol**. v. 55, p. 373-399, 2004.

ARIAS, M. C.; LENARDON, S.; TALEISNIK, E. Carbon metabolism alterations in sunflower plants infected with the Sunflower Chlorotic Mottle Virus. **J. Phytopathol.**, v. 246, n. 151, p. 267-273, 2003.

AZEVEDO, R. A.; ALAS, R. M.; SMITH, R. J.; LEA, P. J. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in leaves and roots of wild-type and catalase-deficient mutant of barley. **Physiol Plant.**, v. 104, p. 280-292, 1998.

BARILE, E.; BONANOMI, G.; ANTIGNANI, V.; ZOLFAGHARI, B.; EBRAHIM SAJJADI, S.; SCALA, F.; LANZOTTI, V. Saponins from *Allium minutiflorum* with antifungal activity. **Phytochemistry**, v. 68, p. 596–603, 2007.

BARRETO, A. L. H. **Estratégias de infecção dos fungos *Colletotrichum lindemuthianum* [(Sacc. & Magnus) Briosi & Cav.] e *Colletotrichum gloeosporioides* [(Penz) Penz & Sacc.] em feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] e respostas bioquímicas e moleculares associadas à defesa da planta.** 2005, 297 f. tese (Doutorado em Bioquímica) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

BELTRAME, A. B. **Interação *Phytophthora nicotianae* - porta-enxerto de citros (tangerina Sunki e citrumelo Swingle): efeito no sistema radicular, aspectos fisiológicos e bioquímicos.** Tese de Doutorado - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

BELTRÁN, R. **Estudios epidemiológicos y de patogenicidad de *Monosporascus cannonballus* Pollack y Uecker.** 2006. 315f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidad Politécnica de Valencia, Espanha.

BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas.** Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, São Paulo, 2009. 341p.

BEZERRA, F. N. R.; ROLIM, R. R.; SANTOS, H. R.; MARCO, C. A.; FEITOSA, J. V.; COSTA, A. N. L. Rendimento do óleo essencial de cidreira brava (*Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown. em diferentes horários de corte. **Cadernos de Agroecologia**, v. 6, n. 2, p. 1-5, 2011.

BHATTACHARJEE, S. Sites of generation and physicochemical basis of formation of reactive oxygen species in plant cell. In: GUPTA, S.D. **Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants.** Enfield: Science Publishers, 2010. cap. 1, p. 1-30.

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.

BONATO, C. M. Homeopatia em modelos vegetais. **Cultura Homeopática**. v. 6, n. 21, p. 24-28.

BORGHEZAN, M.; MORAES, L. K. A.; MOREIRA, F. M.; SILVA, A. L. C. Propagação *in vitro* e avaliação dos parâmetros morfofisiológicos de porta-enxertos de videira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 7, p. 783-789, 2003.

BOTELHO, M. A.; NOGUEIRA, N. A. P.; BASTOS, G. M.; FONSECA, S. G. C.; LEMOS, T. L. G.; MATOS, F. J. A.; MONTENEGRO, D.; HEUKELBACH, J.; RAO, V. S.; BRITO, G.A.C. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, p. 349-356, 2007.

BOWLER, C.; FLUHR, R. The role of calcium and activated oxygens as signals for controlling cross-tolerance. **Trends in Plant Science**, London, v. 5, n. 6, p. 241-246, 2000.

BRAGA, M. R. **Fitoalexinas**. In: PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. (Ed.). *Interação Planta Patógeno – Fisiologia, bioquímica e biologia molecular*. Piracicaba: FEALQ, 2008. p. 305-346.

BUENO, C. J.; AMBRÓSIO, M. M. Q.; SOUZA, N. L. Produção e avaliação da sobrevivência de estruturas de resistência de fungos fitopatogênicos habitantes do solo. **Summa Phytopathologica**, v. 33, n. 1, p. 47-55, 2007.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in food - a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 223- 53, 2004.

CARMO FILHO, F.; ESPÍNOLA SOBRINHO, J.; AMORIM, A. P. **Dados meteorológicos de Mossoró (janeiro de 1898 a dezembro de 1986)**. Mossoró: ESAM/FGD, v. 341, 325p. (Coleção Mossoroense), 1987.

CARNELOSSI, P. R.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; CRUZ, M. E. S.; ITAKO, A. T.; MESQUINI, R. M. Óleos essenciais no controle pós-colheita de *Colletotrichum gloeosporioides* em mamão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 11, n. 4, p. 399-406, 2009.

CARRILLO, N.; VALLE, E. M. El lado oscuro del oxígeno. **Revista de la Sociedad Argentina de Fisiología Vegetal**. Cordoba, v. 2, n. 2, 2005.

CAVALCANTI, L. S.; DI PIERO, R. M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S. F.; VILELA DE RESENDE, M. L.; ROMEIRO, R. S. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, v. 13, p. 51-80, 2006..

CIA, M. C.: **Resposta antioxidativa em variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) sob déficit hídrico**. 2010. 90 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

COHEN, R.; PIVONIA, S.; BURGER, J.; EDELSTEIN, M.; GAMLIEL, A.; KATAN, J. Toward integrated management of *Monosporascus* wilt of melons in Israel. **Plant Disease**, v. 84, n. 5 p. 496-505, 2000.

COLEMAN, J. J.; OKOLI, I.; TEGOS, G. P.; HOLSON, E. B.; WAGNER, F. F.; HAMBLIN, M. R.; MYLONAKIS, E. Characterization of plant-derived saponin natural products against *Candida albicans*. **ACS Chem. Biol.** v. 5, p. 321–332, 2010.

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

DE LEO, M.; DE TOMMASI, N.; SANOGO, R.; D'ANGELO, V.; GERMANÒ, M.P.; BISIGNANO, G.; BRACA, A. Triterpenoid saponins from *Pteleopsis suberosa* stem bark. **Phytochemistry**, v. 67, p. 2623–2629, 2006.

DELLABIGLIA, W. J.; SILVA, M. A.; PINCELLI, R. P.; RHEIN, A. F. L.; ARANTES, M. T.; SANTOS, C. M.; SORRILLA, P. F.; BASSETTO, S. C. **Avaliação de tolerância à seca em cultivares comerciais de cana-de-açúcar por meio de marcadores morfo-fisiológicos**. Anais, 4º Congresso Internacional de Iniciação Científica – CIIC, 2010. Instituto Agrônomo-IAC, Campinas/SP.

DEMARTELAERE, A. C. F. **Seleção de genótipos em cucurbitáceas a *Monosporascus cannonballus* e compatibilidade de porta enxertos**. 2011. 60 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró.

DEWIR, Y. H.; CHAKRABARTY, D.; ALI, M. B.; HAHN, E. J.; PAEK, K. Y. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities of *Euphorbia millii* hyperhydric shoots. **Environmental and Experimental Botany**, v. 58, p. 93-99, 2006.

DINAKARA, C.; DJILIANOV, D.; BARTELS, D. Photosynthesis in desiccation tolerant plants: Energy metabolism and antioxidative stress defense. **Plant Science**, v. 182, p. 29-41, 2012.

DRUMOND, M.A.; KIILL, L.H.P.; LIMA, P.C.F.; OLIVEIRA, M.C.; OLIVEIRA, V.R.; ALBUQUERQUE, S.G.; NASCIMENTO, C.E.S.; CAVALCANTE, J. (2000). Estratégias para o uso sustentável da biodiversidade da caatinga. In: **Seminário para avaliação e identificação de ações prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição de benefícios da biodiversidade do bioma caatinga**. EMBRAPA/CPATSA, UFPE e Conservation International do Brasil, Petrolina.

DUBEY, R. S. **Metal Toxicity, Oxidative stress and antioxidative defense system in plants**. In: GUPTA, S.D. **Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants**. Enfield: Science Publishers, cap. 9, p. 178-203. 2010.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Annals of Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.

EDINGTON, L. V.; KHEW, K. L.; BARRON, G. L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. **Phytopathology**, v. 61, n. 1, p. 42-44, 1971.

EHLERT, P. A. D.; MING, L. C.; MARQUES, M. O. M.; FERNANDES, D. M.; ROCHA, W. A.; LUZ, J. M. Q.; SILVA, R. F. Influência do horário de colheita sobre o rendimento e composição do óleo essencial de erva-cidreira brasileira [*Lippia alba* (Mill.) N. E. Br.]. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 1, p. 72-77, 2013.

FALTIN, F.; LOTTMANN, J.; GROSCH, R.; BERG, G. Strategy to select and assess antagonistic bacteria for biological control of *Rhizoctonia solani* Kühn. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50, p. 811-820, 2004.

FONTENELLE, R. O. S.; MORAIS, S. M.; BRITO, E. H. S.; KERNTOPF, M. R.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; TOMÉ, A. R.; QUEIROZ, M. G. R.; NASCIMENTO, N. R. F.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, p. 934-940, 2007.

FONTES, P. C. R.; PUIATTI, M. Cultura do melão. In: FONTES, P. C. R. **Olericultura: teoria e prática**. UFV. Viçosa – MG, p. 407-428, 2005.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Redox sensing and signaling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. **Physiol Plant.**, v. 119, p. 355-364, 2003.

FOYER, C. H., NOCTOR, G. Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. **Plant Physiol.**, v. 155: p. 2-18, 2011.

FRANZENER, G.; MARTINEZ-FRANZENER, A. S.; STANGARLIN, J. R.; CZEPAK, M. P.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; CRUZ, M. E. S. Atividades antibacteriana, antifúngica e indutora de fitoalexinas de hidrolatos de plantas medicinais. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 28, p. 29-38, 2007.

GARCÍA-JIMÉNEZ, J. Secaimento de ramas por *Macrophomina* (*M. phaseolina*). In: Díaz Rufíz, J. R. Y García-Jiménez, J. (eds). **Enfermedades de las Cucurbitáceas en España**: Valencia: S.E.F.-PHYTOMA, p. 54-56, 1994.

GECHEV, T. S. et al. Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. **Bioassays**. v. 28, p. 1091–1101, 2006.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutase: I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiol.**, v. 59, p. 309-314, 1977..

GIULIETTI, A. M.; BOCAGE NETA, A. L.; SAMPAIO, E. V. S. B; VIRGÍNIO, J. ; QUEIROZ, L. P.; BARRADAS, M. M.; BARBOSA, M.R.V.; HARLEY, R. M. Caatinga: Vegetação e Flora. (Org.). **Biodiversidade da caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação**. Brasília, DF, p. 48-78, 2003.

GIULIETTI, A. M.; CONCEIÇÃO, A.; QUEIROZ, L. P. **Diversidade e caracterização das fanerógamas do semi-árido brasileiro**. Recife: Associação Plantas do Nordeste, 488p, 2006.

GOMES, E. C.; MING, L. C.; MOREIRA, E. A.; MIGUEL, O. G.; MIGUEL, M. D.; KERBER, V. A.; CONTI, A. W. W. FILHO, A. **Rev. Bras. Farm.**, v. 60, n. 2, p. 103, 1997.

GOMES, S. V. F.; NOGUEIRA, P. C. L.; MORAES, V. R. S. Aspectos químicos e biológicos do gênero *Lippia* enfatizando *Lippia gracilis* Schauer. **Eclética Química**, v. 36, n. 1, p. 64-77, 2011.

GORNALL, A.G.; BARDAWILL, C. J. ; MAXIMA, D. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. **Journal of Biology Chemistry**, v.177, p.751-766, 1949.

GRATÃO, P. L.; POLLE, A.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. **Functional Plant Biology**, v. 32, p. 481-494, 2005.

HALLIWELL, B. *New Physiol.* 73, 1974.

HAMMOND-KOSACK, K.; JONES, J. D. G. Responses to plant pathogens. In: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry & molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000.p. 1102-1156.

HAVIR, E. A., MCHALE, N. A.: Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiol**, v. 84, p. 450-455, 1987.

HAWKSWORTH, D. L.; CICCARONE, A. Studies on a species of *Monosporascus* isolated from triticum. **Mycopathologia**, v. 66, n. 3, p.147-151, 1978.

HEATH, R. L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.125, p.189-198, 1968.

HOWE, G. A.; JANDER, G. Plant immunity to insect herbivores. **Annu. Rev. Plant Biol.** 59, 41-66, 2008.

IVANOV, S. Alterations in some oxidative parameters in susceptible and resistant wheat plants infected with *Puccinia recondita* f.sp. *tritici*. **Journal of Plant Physiology**, v. 162, n. 3, p. 275-279, 2005.

JUDD, W. S. et al. Plant systematics: a phylogenetic approach. **Sinauer Associates**, 2. ed. 419 p, 2002.

LAMBERT, R. J. W.; SKANDAMIS, P. N.; COOTE, P. J.; NYCHAS, G. J. E. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, p. 453-62, 2001.

LANZOTTI, V.; ROMANO, A.; LANZUISE, S.; BONANOMI, G.; SCALA, F. Antifungal saponins from bulbs of white onion, *Allium cepa* L. **Phytochemistry**, v. 74, p. 133–139, 2012.

LEME, M. I. S.; CAMARGO, M.; FURLANI, A. C. F. A.; PANIZZI, R. C.; LEITE, R. F.; ROSA, J. Efeito *in vitro* de capim limão no desenvolvimento micelial de *Colletotrichum acutatum*. **Summa Phytopathologica**, v. 33, p. 92, 2007.

LOBATO, A. K. S., GONCALVES-VIDIGAL, M. C.; VIDIGAL FILHO, P. S.; COSTA, R. C. L. CRUZ, F. J. R.; SANTOS, D. G. C.; SILVA, C. R. SILVA, L. I. L. L. SOUZA, L. L. Changes in photosynthetic pigment and carbohydrate content in common bean cultivars infected by *Colletotrichum lindemuthianum*. **Plant Soil Environ.**, v. 55, n. 2, p. 58-61, 2009.

MAIOLI-AZEVEDO, V.; FONSECA-KRUEL, V. S. Plantas medicinais e ritualísticas vendidas em feiras livres no Município do Rio de Janeiro, RJ, Brasil: estudo de caso nas zonas Norte e Sul. **Acta Bot. Bras.**, v. 21, n. 2, p. 263-275, 2007.

MAKINDE, A. A.; IGOLI, J. O.; TA'AMA, L.; SHAIBU, S. J.; GARBA, A. Antimicrobial activity of *Cassia alata*. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 13, p. 1509-1510, 2007.

MARRETO, R. N.; ALMEIDA, E. E. C. V.; ALVES, P. B.; NICULAU, E. S.; NUNES, R. S.; MATOS, C. R. S.; ARAÚJO, A. A. S. Thermal analysis and gas chromatography coupled mass spectrometry analyses of hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex containing *Lippia gracilis* essential oil. **Thermochimica Acta**, v. 475, p. 53-58, 2008.

MARTINEZ, A. S.; FRANZENER, G.; STANGARLIN, J. R. Dano causado por *Bipolaris maydis* em *Panicum maximum* cv. Tanzânia. **Ciências Agrárias**, v. 31, n. 4, p. 863-870, 2010.

MARTYN, R. D.; MERTELY, J. C.; MILLER, M. E.; KATSAR, C.; BAASIRI, M. E. Morphology and germination of *Monosporascus cannonballus* ascospores. **Phytopathology**, v. 82, p. 1115, 1992.

MARTYN, R. D.; MILLER, M. E. *Monosporascus* root rot and vine decline: an emerging disease of melon worldwide. **Plant disease**, v. 80, p.716-725, 1996.

MAUST, B. E.; ESPADAS, F.; TALAVERA.; AGUILAR, M.; SANTAMARIA, J. M.; OROPEZA, C. Changes in carbohydrate metabolism in coconut palms infected with the lethal yellowing phytoplasma. **Phytopathologic**, v. 93, n. 8, p. 976-981, 2003.

MEDEIROS, E. V.; ALBUQUERQUE, J. F. C.; MICHEREFF, S. J.; SALES JÚNIOR, R.; NUNES, G. H. S. Controle de *Monosporascus cannonballus* por tiazolidina-2,4-diona e efeito sobre o agente de controle biológico *Trichoderma spp.* **Caatinga**, v. 19, n. 1, p. 44-50, 2006.

MEDEIROS, E. V. **Densidade populacional de *Monosporascus cannonballus*: relação com a utilização de agrotêxtil, diferentes culturas e tempo de cultivo**. 2008. 89 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró.

MENEZES, M. & SILVA-HANLIN, D.M.W. **Guia Prático para Fungos Fitopatogênicos**. Recife: UFRPE, Imprensa Universitária, 106p., 1997.

MERTELY, J. C.; MARTYN, R. D.; MILLER, M. E.; BRUTON, B. D. The role of *Monosporascus cannonballus* and other fungi in a root rot disease of muskmelon. **Plant Disease**, v. 75, n. 11, p. 1133-1137, 1991.

MERTELY, J. C.; MARTYN, R. D.; MILLER, M. E.; BRUTON, B. D. An expanded host range for the muskmelon pathogen *Monosporascus cannonballus*. **Plant Disease**, v. 77, p. 667-673. 1993.

MITTLER, R.: Oxidative stress, antioxidants e stress tolerance. - **Trends Plant Sci.** v. 7, p. 405-410, 2002.

MORAIS, S. M.; CAVALCANTI, E. S. B.; BERTINI, L. M.; OLIVEIRA, C. L. L.; RODRIGUES, J. R. B.; CARDOSO, J. H. L. Larvicidal activity of essential oils from Brazilian *Croton* species against *Aedes aegypti* L. **J. Am. Mosq. Control. Assoc.**, v. 22, p. 161-164, 2006.

MORAIS, L. A. S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**. v. 27, n. 2 (Suplemento CD Rom), p. 4050 – 4063, 2009.

MORAIS, M. B. **Ação combinada de fatores abióticos de estresse em variedades de cana-de-açúcar: variáveis fisiológicas e bioquímicas**. 2013. 75 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

MORIONDO, M. et al. The effect of downy and powdery mildew on grapevine (*Vitis vinifera* L.) leaf gas exchange. **Phytopathology**, Ithaca, v. 153, p. 350-357, 2005.

MOSCA, V. P.; LOIOLA, M. I. B. Uso popular de plantas medicinais no Rio Grande do Norte, Nordeste do Brasil. **Revista Caatinga**, v. 22, n. 4, p. 225-234, 2009.

MOTA, M. L.; LOBO, L. T. C.; COSTA, J. G. M.; COSTA, L. S.; ROCHA, H. A. O.; SILVA, L. F. R.; POHLIT, A. M.; ANDRADE-NETO, V. F. A. *In Vitro* and *In Vivo* Antimalarial activity of essential oils and chemical components from three medicinal plants found in Northeastern Brazil. **Planta Medica**, v. 78, p. 658-664, 2012.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplast. **Plant Cell Physiol.**, v. 22, p. 867-880, 1981.

NASCIMENTO, L. C.; NERY, A. R.; RODRIGUES, L. N. Controle de *Colletotrichum gloeosporioides* em mamoeiro, utilizando extratos vegetais, indutores de resistência e fungicida. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 30, n. 3, p. 313-319, 2008.

NAYYAR, H.; GUPTA, D. Differential sensitivity of C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> plants to water deficit stress: Association with oxidative stress and antioxidants. **Environ. Exp. Bot.**, v. 58, p. 106-113, 2006.

NEIL, S. J.; DESIKAN, R.; CLARKE, A.; HURST, R. D.; HANCOCK, J. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signal molecules in Planting. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 1237-1247, 2002.

NETO, R. M.; MATOS, F. J. A.; ANDRADE, V. S.; MELO, M. C. N.; CARVALHO, C. B. M.; GUIMARÃES, S. B.; PESSOA, O. D. L.; SILVA, S. L.; SILVA, S. F. R.; VASCONCELOS, P. R. L. The essential oil from *Lippia gracilis* Schauer, Verbenaceae, in diabetic rats. **Rev. Bras. Farmacognosia**, v. 20, n. 2, p. 261-266, 2010.

NOGUEIRA, M. A.; DIAZ, G.; SAKUMO, L. Caracterização química e atividade biológica do óleo essencial de *Lippia alba* cultivada no Paraná. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 3, p. 273 - 278, 2007.

NOSTRO, A.; ROCCARO, A. S.; BISIGNANO, G.; MARINO, A.; CANNATELLI, A. PIZZIMENTI, F. C.; CIONI, P. L.; PROCOPIO, F.; BLANCO, A. R. Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, p. 519–523, 2007.

OLIVEIRA, D. R.; LEITÃO, G. G.; SANTOS, S. S.; BIZZO, H. R.; LOPES, D.; ALVIANO, C. S.; ALVIANO, D. S.; SUZANA, G. L. Ethnopharmacological study of two *Lippia* species from Oriximiná, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 108, p. 103–108, 2006.

OLIVEIRA, D. R.; LEITÃO, G. G.; BIZZO, H. R.; LOPES, D.; ALVIANO, D. S.; ALVIANO, C. S.; LEITÃO, S. G. Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia origanoides* H. B. K. **Food Chemistry**, v. 101, p. 236–240, 2007.

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

OLIVEIRA JUNIOR, L. F. G.; SANTOS, R. B.; REIS, F. O.; MATSUMOTO, S. T.; BISPO, W. M. S.; MACHADO, L. P.; OLIVEIRA, L. F. M. Efeito fungitóxico do óleo essencial de aroeira da praia (*Schinus terebinthifolius* RADDI) sobre *Colletotrichum gloeosporioides*. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 15, n. 1, p. 150-157, 2013.

ONG, K. C.; KHOO, H. E. Effects of myricetin on glycemia and glycogen metabolism in diabetic rats. **Life Sciences**, v. 67, p. 1695-1705, 2000.

PASCUAL, M. E.; SLOWING, K. E.; CARRETERO, D.; SÁNCHEZ MATA, A. V. J. **Ethnopharmacol.** v. 76, 2001.

PEREIRA, A. C. R. L.; OLIVEIRA, J. V.; GONDIM JUNIOR, M. G. C.; CAMARA, C. A. G. Atividade inseticida de óleos essenciais e fixos sobre *Callosobruchus maculatus* (Fabr., 1775) (Coleoptera: Bruchidae) em grãos de caupi [*Vigna unguiculata* (L.) WALP.]. **Ciênc. Agrotec.** v. 32, p. 717-724, 2008.

PIVONIA, S.; COHEN, R.; KAFKAFI, U.; BEM ZE"EV, I. S.; KATAN, J. Sudden wilt of melons in Southern Israel: fungal agentes and relationship with plant development. **Plant Disease**, v. 81, n.11, 1997.

PIVONIA, S.; COHEN, R.; KATAN, J.; KIGEL, J. Effect of fruit load on the water balance of melon plants infected with *Monosporascus cannonballus*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 60, p. 39-49, 2002.

POLLACK F. G.; UECKER F. A. *Monosporascus cannonballus*, an unusual Ascomycete in cantaloupe roots. **Mycologia**, v. 66, p. 346-349, 1974.

PRASAD, M. N. V. Radicales libres (FR<sup>1</sup>) Y species reactivas del oxígeno (ROS<sup>2</sup>). In: REIGOSA, M. J.; PEDROL, N.; SÁNCHEZ, A. **La ecofisiología vegetal: una ciencia de síntesis**. Madrid: Thompson, 2004. p. 775-790.

RAGAGNIN, R. C. G. **Efeito do estresse salino no crescimento e na qualidade do óleo essencial de *Lippia gracilis* Schauer**. 2013. 46 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, Mossoró, RN.

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

REGNIER, T.; PLOOY, W.; COMBRINCK, S.; BOTHA, B. Fungitoxicity of *Lippia scaberrima* essential oil and selected terpenoid components on two mango postharvest spoilage pathogens. **Postharvest Biology and Technology**, v. 48, p. 254-258, 2008.

SADRAS, V. O. et al. Effect of *Verticillium dahliae* on photosynthesis, leaf expansion and senescence of field-grown sunflower. **Annals of Botany**, v. 86, p. 1007-1015, 2000.

SAHA, S.; WALIA, S.; KUMAR, J.; PARMAR, B. S. Structure–biological activity relationships in triterpenic saponins: the relative activity of protobassic acid and its derivatives against plant pathogenic fungi. **Pest Manage. Sci.**, v. 66, p. 825– 831, 2010 .

SAIRAM, R. K.; SRIVASTAVA, G. C. Induction of oxidative stress and antioxidant activity by hydrogen peroxide treatment in tolerant and susceptible wheat genotypes. **Biology Plantarum**, v. 43, p. 381-386, 2000.

SANKAR, B.; JALEEL, C. A.; MANIVANNAN, P.; KISHOREKUMAR, A.; SOMASUNDARAM, R.; PANNEERSELVAM, R. Effect of paclobutrazol on water stress amelioration through antioxidants and free radical scavenging enzymes in *Arachis hypogaea* L. **Colloid Surface B.**, v. 60, p. 229-235, 2007.

SALES JR., R.; VICENT, A.; ARMENGOL, J.; GARCIA-JIMÉNEZ, J.; KOBORI R. F. Comportamento de cultivares de meloeiro e melancia inoculados com *Acremonium cucurbitacearum* e *Monosporascus cannonballus*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, n. 2, p. 206-210, 2002.

SALES JÚNIOR, R.; OLIVEIRA, O. F.; SENHOR, R. F.; ALVES, M. Z. *Monosporascus cannonballus* agente causal do colapso em plantas de melão no Rio Grande do Norte. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 5, p. 567, 2003.

SANTOS, M. R. A.; INNECCO, R.; SOARES, A. A. Caracterização anatômica das estruturas secretoras e produção de óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. em função do horário de colheita nas estações seca e chuvosa. **Revista Ciência Agronômica**, v. 35, n. 2, p. 377-383, 2004.

SARRAZIN, S. L. F.; OLIVEIRA R. B.; BARATA, L. E. S.; MOURÃO, R. H. V. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Lippia grandis* Schauer (Verbenaceae) from the western Amazon. **Food Chemistry**, v. 134, p. 147-1478, 2012.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; PASCHOLATI, S. F. **Mecanismos bioquímicos de defesa vegetal**. In: PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. (Ed.). Interação Planta Patógeno – fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular. Piracicaba: FEALQ, 2008. p. 227-248.

SENA FILHO, J. G.; MELO, J. G. S.; SARAIVA, A. M.; GONÇALVES, A. M.; PSIOTTANO, M. N. C.; XAVIER, H. S. Antimicrobial activity and phytochemical profile from the roots of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown. **Rev Bras Farmacogn.**, v. 16, p. 506-509, 2006.

SENHOR, R. F.; CARVALHO, J. N.; SOUZA, P. A.; ANDRADE NETO, R. C.; MARACAJÁ, P. B. Eficiência de diferentes fungicidas no controle de *Alternaria alternata*, agente causal da podridão pós-colheita em frutos do meloeiro. **Revista Caatinga**, v. 22, n. 4, p. 14-19, 2009.

SILVA, S. R. S.; DEMUNER, A. J.; BARBOSA, L. C. A.; CASALI, V. W. D.; NASCIMENTO, E. A.; PINHEIRO, A. L. Efeito do estresse hídrico sobre características de crescimento e a produção de óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel. **Acta Scientiarum**, v. 24, n. 5, p. 1363-1368, 2002.

SILVA, K. J. P.; CORDEIRO, A. G.; NOGUEIRA, D. R. S.; SALES JUNIOR, R. *Monosporascus cannonballus*: Agente causal do colapso ou morte súbita do meloeiro. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 5, p. 11-18, 2010.

SILVA, V. M.; COSTA-CARVALHO, R. R.; FONTES, G. M.; ARAUJO, E. R.; PIMENTA NETO, A. A.; BLANK, A. F.; LARANJEIRA, D. Atividade antifúngica de *Lippia sidoides* e *Lippia gracilis* na inibição do crescimento de *Rhizoctonia solani*. In: 52º Congresso Brasileiro de Olericultura, 2012, Salvador. **Agroindustrialização de hortaliças: geração de emprego e renda no campo**, 2012. v. 30. p. 2135-2140.

- SILVEIRA, W. L. **Respostas fisiológicas e bioquímicas em meloeiro (*Cucumis melo* L.) inoculado com fungos micorrízicos arbusculares sob estresse salino.** 2008. 75 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.
- SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre / Florianópolis: Editora UFRGS/ Editora UFSC, 2003. p. 467-495.
- SIVANESAN, A. *Monosporascus cannonballus*. **Mycopathologia**, v. 114, p. 53-54, 1991.
- SOARES, A. M. DOS S.; MACHADO, O. L. T. Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. **Revista Trópica - Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 1, n. 1, p. 9, 2007.
- SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **BOTÂNICA SISTEMÁTICA: Guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III.** 3ªed. Editora Plantarum. 768 p., 2012.
- STANGARLIN, J. R.; PASCHOLATI, S. F. Atividades de ribulose-1,5-bifosfato carboxilase-oxigenase (rubisco), clorofilase,  $\beta$ -1,3 glucanase e quitinase e conteúdo de clorofila em cultivares de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) infectados com *Uromyces appendiculatus*. **Summa Phytopathologica**, v. 26, n. 1, p. 34-42, 2000.
- STANGARLIN, J. R.; KUHN, O. J.; TOLEDO, M. V.; PORTZ, R. L.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; PASCHOLATI, S. F. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 10, n. 1, p. 18-46.
- STANGUELLINI, M. E.; KIM, D. H.; WAUGH, M. M.; RADEWALD, K. C.; SIMS, J. J.; OHR, H. D.; MAYBERRY, K. S.; TURINI, T.; MCCASLIN, M. A. Vine decline of melons caused by *Monosporascus cannonballus*: I. preplant disease management strategies. **Phytopathology**, v. 91 p. 84, 2001.
- STANGHELLINI, M. E.; WAUGH, M. M.; RADEWALD, K. C.; KIM, D. H.; FERRIN, D. M.; TURINI, T. Crop residues destruction strategies that enhance rather than inhibit reproduction of *Monosporascus cannonballus*. **Plant Pathology**, v. 53, p. 50-53, 2004.
- STASOLLA, C. Glutathione redox regulation of in vitro embryogenesis. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, p. 319-327, 2010.
- STEFANUTO, V. A. **Efeito do cálcio na homeostase de brotações de um clone de *Eucalyptus grandis* Hill (ex Maiden) sob condições de deficiência hídrica induzida *in vitro*.** 2002. 65 f. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.
- SUNG, W. S., LEE, D. G. *In vitro* candidacidal action of Korean red ginseng saponins against *Candida albicans*. **Biol. Pharm.**, v. 31, p. 139–142, 2008.

TAGAMI, O. K.; GASPARIN, M. D.; SCHWAN-ESTRADA, K, R, F.; SILVA CRUZ, M. E.; ITAKO, A. T.; TOLENTINO JÚNIOR, J. B.; MORAES, L. M.; STANGARLIN, J. R. Fungitoxidade de *Bidens pilosa*, *Thymus vulgaris*, *Lippia alba* e *Rosmarinus officinalis* no desenvolvimento in vitro de fungos fitopatogênicos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 30, n. 2, p. 285-294, 2009.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4 ed. Editora Artmed, 2009, 848 p.

TIAN, J.; BAN, X.; ZENG, H.; HUANG, B.; HE, J.; WANG, Y. *In vitro* and *in vivo* activity of essential oil from dill (*Anethum graveolens* L.) against fungal spoilage of cherry tomatoes. **Food Control**, v. 22, p. 1992-1999, 2011.

TYAGI, A. K.; MALIK, A. Antimicrobial potential and chemical composition of *Mentha piperita* oil in liquid and vapour phase against food spoiling microorganisms. **Food Control**, v. 22, p. 1707-1714, 2011.

TORRES, M. A.; JONES, J. D. G.; DANGL, J. L. Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. **Plant Physiol.**, v. 141, p. 373-378, 2006.

TORRES, M. A. ROS in biotic interactions. - **Physiol Plant.**, v. 138, p. 414-429, 2010.

TROUTMAN, J. L. E.; MATEJKA, J. C. Three fungi associated with cantaloupe roots in Arizona. **Phytopathology**, v. 60, p. 1317, 1970.

TYAGI, A. K.; MALIK, A. Antimicrobial potential and chemical composition of *Mentha piperita* oil in liquid and vapour against food spoiling microorganisms. **Food Control**. v. 22, p.1707-1714, 2011.

ULBRECHT, U.; BOWMAN, K. D. Growth comparison of citrus rootstocks after artificial infection with *Phytophthora*. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Florida, v. 117, p. 156-160, 2004.

WANG, W.; VINOCUR, B.; ALTMAN, A. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. **Planta**, v. 218, p. 1-14, 2003.

WATANABE, T. *Monosporascus cannonballus*, an ascomycete from wilted melon roots undescribed in Japan. **Transactions Mycological Society of Japan**, Boca Raton, v. 20, n. 6, p. 312-316, 1979.

WAUGH, M. M.; KIM, D,H; FERRIN, D. M; STANGHELLINI, M. E; Reproductive potential of *Monosporascus cannonballus*. **Plant Disease**, v. 87, p. 45-50, 2003.

VAN DYCK, S.; FLAMMANG, P.; MERIAUX, C.; BONNEL, D.; SALZET, M.; FOURNIER, I.; WISZTORSKI, M. Localization of secondary metabolites in marine invertebrates: contribution of MALDI MSI for the study of saponins in cuvierian tubules of *H. forskali*. **PLoS One**, v. 5, e 13923, 2010.

VENTUROSOS, L. R. **Extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos à soja.** Dissertação (Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal). Universidade Federal da Grande Dourados: Dourados Mato Grosso do Sul. 2009. 99p.

VIANA, M. G. **Avaliação de produtos naturais no controle de biofilmes formados em sistema dinâmico.** 2010. 90 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, 2010.

ZARE, Z.; MAJD, A.; SATTARI, T. N.; IRANBAKHSH, A.; MEHRABIAN, S. Antimicrobial activity of leaf and flower extracts of *Lippia nodiflora* L. (Verbenaceae). **Journal of Plant Protection Research**, v. 52, n. 4, p. 401-403, 2012.