



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL**

**CAMPUS LARANJEIRAS DO SUL**

**CURSO DE AGRONOMIA**

**IDAIANE MARIA RIBEIRO DE OLIVEIRA**

**CONTROLE DE *Alternaria solani* EM TOMATEIRO COM ÓLEO ESSENCIAL DE  
PITANGUEIRA**

**LARANJEIRAS DO SUL**

**2017**

**IDAIANE MARIA RIBEIRO DE OLIVEIRA**

**CONTROLE DE *Alternaria solani* EM TOMATEIRO COM ÓLEO ESSENCIAL DE  
PITANGUEIRA**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação  
apresentado como requisito para obtenção de grau de  
Bacharel em Agronomia na Universidade Federal da  
Fronteira Sul.

Orientador: Prof. Dr. Gilmar Franzener

**LARANJEIRAS DO SUL**

**2017**

Oliveira, Idaiane Maria Ribeiro de  
CONTROLE DE ALTERNARIA SOLANI EM TOMATEIRO COM ÓLEO  
ESSENCIAL DE PITANGUEIRA / Idaiane Maria Ribeiro de  
Oliveira. -- 2017.  
44 f.:il.

Orientador: Gilmar Franzener.  
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -  
Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de  
Agronomia , Laranjeiras do Sul, PR, 2017.

1. Fitopatologia. 2. Pinta preta em tomateiro. 3.  
Controle alternativo. 4. Óleo essencial. I. Franzener,  
Gilmar, orient. II. Universidade Federal da Fronteira  
Sul. III. Título.

**IDAIANE MARIA RIBEIRO DE OLIVEIRA**

**CONTROLE DE *Alternaria solani* EM TOMATEIRO COM ÓLEO  
ESSENCIAL DE PITANGUEIRA**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado como requisito para obtenção de grau de Bacharel em Agronomia – Linha de formação em Agroecologia da Universidade Federal da Fronteira Sul - *Campus* Laranjeiras do Sul (PR).

Orientador: Prof. Dr. Gilmar Franzener

Este trabalho de conclusão de curso foi defendido e aprovado pela banca em:

16 / 02 / 2017

**BANCA EXAMINADORA**



Prof. Dr. Gilmar Franzener - UFFS



Profª Drª Gabriela da Silva Moura - UFFS



Profª Drª Aline Pomari Fernandes - UFFS

Dedico esse trabalho a minha família pelo apoio e incentivo em todos os momentos de minha vida.

Aos professores pelo ensinamento em toda minha trajetória acadêmica.

Ao meu orientador pela paciência, consideração e dedicação.

Aos meus amigos pela amizade e apoio.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela vida e por todas as oportunidades que me concedeu para buscar novas conquistas.

A toda a minha família, meus irmãos Jardel e Jane e principalmente aos meus pais Anadir Clotilde de Oliveira e João Batista Ribeiro de Oliveira, pelo incentivo, apoio e amor incondicional.

Agradeço aos meus tios, Tania e Deomar pela acolhida em vossa casa todo o período de minha graduação, pela paciência e confiança.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Gilmar Franzener por me receber e mostrar o caminho correto a ser seguido, com paciência e dedicação em todas as etapas deste trabalho.

A Prof<sup>a</sup>. Dra. Gabriela Silva Moura, que se disponibilizou em auxiliar nas etapas laboratoriais exigidas neste trabalho.

A todos os Professores e funcionários da Universidade Federal da Fronteira Sul, *Campus* Laranjeiras do Sul, que fizeram parte da minha graduação no curso de Agronomia deste *Campus*.

A todos os meus amigos e colegas que o curso de agronomia me proporcionou e que de alguma maneira tornaram minha caminhada acadêmica cada dia mais gratificante, principalmente minha amiga Silmara Pietrobelli pela amizade e apoio prestados durante a graduação e especialmente na execução deste trabalho.

E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

## RESUMO

O tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) é uma das principais hortaliças de valor econômico no mundo. Apresenta amplo histórico de problemas fitossanitários, responsáveis por perdas de produção, como a doença pinta preta causada pelo fungo *Alternaria solani*. Assim, o objetivo do trabalho foi avaliar o controle alternativo da pinta preta do tomateiro pelo uso do óleo essencial de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.). Os experimentos foram conduzidos na Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Laranjeiras do Sul em condições de laboratório e casa de vegetação. O fungo foi obtido de frutos de tomate infectados e isolado no laboratório de Fitopatologia, em meio batata dextrose ágar (BDA). A concentração da suspensão de conídios utilizada foi ajustada para  $1 \times 10^4$  conídios mL<sup>-1</sup> em hemacitômetro. O experimento de crescimento micelial foi realizado em placas de Petri com BDA contendo as concentrações (0,01%, 0,05%, 0,1%, 0,5% e 1%) do óleo essencial e o de germinação de esporos foi realizado em placas de Elisa. Para avaliar o efeito do óleo essencial *in vivo*, foi realizado teste em casa de vegetação, em plantas de tomateiro, nas concentrações de 0,01%, 0,05%, 0,1% e 0,5%. Para avaliação da atividade de mecanismos relacionados a defesa foram realizadas análises bioquímicas de peroxidase, polifenoloxidase, fenilalanina amônia-liase, proteínas totais e carboidrato. O óleo essencial foi diluído em água destilada contendo 0,1% Tween 20. Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizados 5 repetições. O OE promoveu efeito inibitório significativo sobre o crescimento micelial, germinação de esporos e tamanho dos tubos germinativos, sobretudo em maiores concentrações. O OE promoveu redução no número de lesões da pinta preta já a partir da concentração de 0,01%. Também houve aumento linear na atividade de peroxidases, polifenoloxidases e proteínas totais, tanto em folhas tratadas como não tratadas, indicando efeito local e sistêmico. Esses resultados indicam o potencial do óleo essencial de pitangueira para controle da pinta preta em tomateiro.

Palavras-chave: Controle alternativo. *Lycopersicum esculentum*. Proteção de plantas.

## ABSTRACT

The tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) is one of the main vegetables of economic value in the world. Features extensive history of problems, responsible for production losses, such as black paint caused by the fungus *Alternaria solani*. Thus, the objective of this work was to evaluate the alternative control of tomato by using black paint of the essential oil of Surinam Cherry (*Eugenia uniflora* L.). The experiments were conducted at the Universidade Federal da Fronteira Sul, *Campus Laranjeiras do Sul* under laboratory conditions and vegetation. The fungus was obtained from fruits of tomato infected and isolated in the laboratory of plant pathology, potato dextrose agar medium in (BDA). The suspension of conidia concentration used was adjusted to  $1 \times 10^4$  conidia mL<sup>-1</sup> in hemacitômetro. The Mycelial growth experiment was conducted in Petri dishes with BDA containing concentrations (0.01%, 0.05%, 0.1%, 0.5% and 1%) and essential oil of germination of spores was real. To evaluate the effect of essential oil in vivo test was carried out in a greenhouse, in tomato plants, at concentrations of 0.01%, 0.05%, 0.1% and 0.5%. For evaluation of the activity of defence-related mechanisms were performed analysis of peroxidase biochemical, polifenoloxidase, phenylalanine ammonia-lyase, total protein and carbohydrate. The essential oil was diluted in distilled water containing 0.1% Tween 20. The experiments were conducted in fully randomized design 5 repetitions. OE promoted significant inhibitory effect on Mycelial growth, germination of spores and size of germinativos tubes, especially in higher concentrations. OE promoted a reduction in number of lesions of the black paint from the concentration of 0.01%. There was also an increase in the activity of linear peroxidases, polifenoloxidases and total protein in leaves treated as not having been treated, indicating local and systemic effect. These results indicate the potential of essential oil of Surinam to control paints in black tomato plants.

Keywords: alternative control. *Lycopersicum esculentum*. Protection of plants.



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>10</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>11</b>
2.1. OBJETIVO GERAL .....	11
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	11
<b>3 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>11</b>
<b>4 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>12</b>
4.1 A CULTURA DO TOMATEIRO .....	12
4.2 PINTA PRETA ( <i>Alternaria solani</i> ) .....	14
<b>4.2.1 Aspectos da doença</b> .....	<b>14</b>
<b>4.2.2 Etiologia do patógeno</b> .....	<b>15</b>
4.3 PITANGUEIRA ( <i>Eugenia uniflora</i> L.) .....	16
4.4 ÓLEOS ESSENCIAIS .....	16
<b>4.4.1 Óleos essenciais no controle de doenças</b> .....	<b>16</b>
<b>4.4.2 Óleo essencial de pitanga (<i>Eugenia uniflora</i> L.)</b> .....	<b>18</b>
<b>5 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>19</b>
5.1 OBTENÇÃO DO FITOPATÓGENO E DO ÓLEO ESSENCIAL .....	19
5.2 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA .....	20
5.3 PROTEÇÃO DE PLANTAS .....	21
5.4 ANÁLISES BIOQUÍMICAS .....	22
5.5 ANÁLISE DOS DADOS.....	24
<b>6 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>24</b>
6.1 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA .....	24
6.2 PROTEÇÃO DE PLANTAS .....	28
6.3 ANÁLISES BIOQUÍMICAS .....	30
<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	<b>36</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>37</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) é uma solanácea herbácea, que possui caule flexível e apesar de ser uma planta perene, apresenta comportamento anual com o ciclo biológico variando de quatro a sete meses (FILGUEIRA, 2007), acredita-se que sua origem ocorreu na parte ocidental das Américas Central e do Sul (FERREIRA, 2004). Compõe o grupo das principais hortaliças de valor econômico no mundo, é a segunda solanácea mais cultivada, sendo superada apenas pela batata (ABREU, 2006, CABRAL, 2012).

A produção nacional do tomate vem progredindo nitidamente durante as décadas, como pode ser verificado quando comparado a produção no ano de 1990 a qual foi de 2.260.871 toneladas, já no ano de 2012 a produção nacional teve um expressivo aumento alcançando 3.873.985 toneladas (FAO-FAOSTAT, 2015). O Brasil ocupa a oitava posição na classificação mundial de produção de tomate, com um volume de aproximadamente 4,2 milhões de toneladas por ano (SILVA, 2015).

A planta origina um fruto muito apreciado mundialmente, caracterizado por ser carnoso e suculento, que pode apresentar variações quanto ao aspecto, tamanho e peso, de acordo com cada cultivar. Possui grande importância nutricional em virtude dos nutrientes de sua composição, sendo que entre os principais está o carotenoide licopeno responsável pela sua coloração (FILGUEIRA, 2007).

A cultura do tomateiro se destaca por apresentar amplo histórico de problemas fitossanitários, os quais são os grandes responsáveis por perdas significativas na produção (LUCAS, 2012).

*Alternaria solani* (Ellis & G. Martin) L.R. Jones & Grout, causador da pinta preta do tomateiro é um dos principais patógenos promotores de doença na cultura (TOMAZONI, 2013). Para contornar esse problema, os produtores adotam medidas de controle, que geralmente limitam-se ao uso de produtos químicos, além disso, quando ocorrem de forma indiscriminada, resulta em danos ambientais e seleção de patógenos resistentes a estes produtos (FRANZENER et al., 2007).

Contudo, técnicas que consistem no emprego de produtos alternativos como óleos e extratos vegetais devem ser investigadas como estratégias de controle de patógenos em plantas (LUCAS, 2012; TOMAZONI, 2013).

Produtos como óleo essencial e extratos obtidos a partir de plantas indicam um potencial no controle de fitopatógenos, sendo através de ação fungitóxicas direta ou indução de resistência, caracterizando presença de compostos eliciadores (BALBI-PEÑA et al., 2006).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Contribuir para a utilização do óleo essencial de pitangueira (*Eugenia uniflora*) no controle da pinta preta do tomateiro.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade antifúngica direta do óleo essencial de pitangueira (*Eugenia uniflora*) sobre *Alternaria solani*;
- Avaliar o efeito protetor do óleo essencial de pitangueira (*Eugenia uniflora*) em plantas de tomateiro em relação a *Alternaria solani*;
- Avaliar a ativação de mecanismos de defesa em plantas de tomateiro pelo óleo essencial de pitangueira (*Eugenia uniflora*).

## 3. JUSTIFICATIVA

A cultura do tomate apresenta grande destaque dentre as culturas olerícolas, devido a sua aceitação no mercado consumidor, estando presente na gastronomia de diversas culturas. A cultura adapta-se bem ao Brasil, porém o cultivo desta planta a campo está constantemente exposto e suscetível à incidência de pragas e doenças, sendo a pinta preta causada pelo fungo *Alternaria solani* uma das principais doenças que interferem e limitam a produção desta olerícola e que a caracteriza como a doença de maior ocorrência em cultivos de diversas regiões brasileiras (TOLEDO, 2009).

Como método de controle utilizado para esta doença, o uso de fungicidas tem sido praticamente único, para grande parte dos agricultores. No entanto, esta forma de controle apresenta custos econômicos elevados e diversos problemas de contaminação ambiental (SARMIENTO, MORETTO, CHURATA-MASCA, 1999).

O controle da pinta preta, assim como outras doenças de ocorrência na cultura do tomate, como a murcha-de-verticílio (*Verticillium dahliae*), podridão-de-esclerócio (*Sclerotium rolfsii*), requeima (*Phytophthora infestans*), mancha-bacteriana (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*), é realizado principalmente com produtos químicos. Porém com o

crescimento da consciência ecológica e difusão dos produtos orgânicos, surge a necessidade por produtos alternativos para o controle desta doença, evitando o uso de produtos químicos.

Em razão da necessidade de produzir alimentos saudáveis nos últimos anos o cultivo orgânico vem obtendo destaque no mercado consumidor estimulando o produtor a expandir as áreas de produção sem a utilização de insumos químicos. Para isso são desenvolvidas técnicas conservacionistas em todo o sistema produtivo (PEDROSA et al., 2011). Entretanto devido à massiva incidência desta doença nos tomateiros busca-se desenvolver alternativas de controle para a mesma, que vise à preservação do ambiente e conserve a qualidade de vida, produzindo alimentos saudáveis como reconhece Abreu (2006).

A crescente procura por alimentos mais saudáveis incide na necessidade de se produzir utilizando meios eficientes de produção, que não causem danos à saúde e ao meio ambiente e de forma economicamente viável, o que também buscam os agricultores (TOLEDO, STANGARLIN, BONATO, 2015). Neste sentido estudos sobre o manejo fitossanitário das culturas torna-se indispensável, sendo por este motivo, a intensificação de pesquisas com substâncias vegetais para o controle de doenças na agricultura, em um novo enfoque de desenvolvimento tecnológico para o meio agrícola, enfatizando novos conceitos de sustentabilidade, otimizando a produção de alimentos saudáveis, de alta qualidade e menor impacto ao meio ambiente (ABREU, 2006; TOLEDO, 2009).

## **4. REFERENCIAL TEÓRICO**

### **4.1 A CULTURA DO TOMATEIRO**

O tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) é uma planta que pertence à família Solanaceae, originária das regiões andinas, principalmente dos países Peru, Bolívia e Equador, produzindo o fruto conhecido pelos indígenas mexicanos por tomati ou jitomate. O tomate já era utilizado e difundido pela América do Sul, América Central e México quando começou a ser cultivado na Europa no século XVI, porém somente no século XIX tornou-se uma cultura de amplo cultivo e consumo, sendo introduzida no Brasil por imigrantes europeus no final deste mesmo século (EMBRAPA, 1993).

A planta era utilizada somente para ornamentação de jardins. Em virtude de sua coloração vermelha julgava-se que os frutos seriam venenosos e impróprios ao consumo e também pelo fato de ser da mesma família de plantas consideradas tóxicas (FILGUEIRA, 2007).

O tomate (*L. esculentum* Mill.) destaca-se dentre as principais olerícolas produzidas no mundo, sendo a segunda solanácea de maior cultivo. Este fato se deve ao alto consumo *per capita* do fruto e pela cultura ser muito difundida e apresentar grande importância econômica, já que se trata de uma olerícola de grande aceitabilidade (PAULA et al., 2011; ABREU, 2006).

A arquitetura da planta é caracterizada por dois hábitos de crescimento, sendo o tipo indeterminado o qual ocorre na maioria das cultivares para a produção de frutos para mesa e o hábito determinado é característico das cultivares adaptadas especialmente para a cultura rasteira, cujos frutos destinam-se para a agroindústria. Contudo, o que define cada situação de crescimento como indeterminado ou determinado é a posição dos ramos florais e a disposição das folhas e frutos (FILGUEIRA, 2007; NAIKA et al., 2006)

O fruto é classificado como climatérico e sua maturação é controlada por vários fatores fisiológicos e bioquímicos, que se alteram e provocam variabilidade nas características de sabor, odor e textura principalmente (PAULA et al., 2011). Com relação ao sabor, a principal característica é definida pelos teores de sólidos solúveis presentes no fruto, sendo que nestes são encontrados os ácidos e açúcares que conferem a peculiaridade gustativa do tomate (SHIRAHIGE et al., 2010).

Quanto à textura, de acordo com Ferreira (2004) na medida em que os frutos amadurecem a textura dos mesmos vai diminuindo, tornando-o mais frágil, isto se deve às reações físico-químicas que ocorrem a partir do início do amadurecimento. Além disso, o tomate é considerado uma fonte de minerais, vitaminas, aminoácidos essenciais, açúcares, fibras, fósforo e ferro além de conter uma substância antioxidante denominada licopeno, que auxilia na prevenção do câncer (CABRAL, 2012).

O tomate foi a primeira olerícola a ser industrializada, em virtude de suas características fisiológicas, que apresenta grande fragilidade, podendo levar a degradação do fruto em curto espaço de tempo (CAMARGO et al., 2006). As diversas formas de consumo do fruto, tanto na forma *in natura*, como na forma industrializada, propiciam ao tomate grande destaque quanto a sua importância (MORAES et al., 2011).

A cultura do tomate ou tomaticultura está presente em todo o território brasileiro, principalmente na região Sudeste. Esta região corresponde especialmente à produção de tomates de mesa. Já a região Centro-Oeste atua essencialmente na produção de tomates destinados à indústria (SOUZA et al., 2014).

A produção de tomate no Brasil, no entanto limita-se em decorrência de diversos fatores, sendo um dos principais empecilhos para o sucesso da cultura às doenças, como foi

observado por Moraes et al., (2011). Além do que, as doenças podem ser de origem bacteriana, fúngica ou viral, destacando-se entre as doenças fúngicas que afetam o tomateiro, a pinta preta (*Alternaria solani*).

## 4.2 PINTA PRETA (*Alternaria solani*)

### 4.2.1 Aspectos da doença

A pinta preta é causada pelo fungo *Alternaria solani*, sendo uma das doenças de maior relevância para a cultura. Pode acometer a planta em qualquer estágio de desenvolvimento desde que encontre condições satisfatórias (CATÃO et al, 2011).

Os três fatores necessários para que uma doença se manifeste depende da suscetibilidade da planta, a presença do patógeno em sua forma virulenta e a condição ambiental favorável (CABRAL, 2012). No que se refere a *A. solani*, a germinação de conídios, infecção e esporulação do fungo depende de umidade e esta se torna disponível por meio da chuva, irrigação ou até mesmo o orvalho (TÖFOLI; DOMINGUES; FERRARI, 2015).

Esta doença é verificada em todas as regiões onde é cultivado o tomate, sendo considerada de maior incidência sob condições de temperatura entre 25°C e 30°C e alta umidade, porém pode estar presente em regiões de clima semi-árido, em que apresente orvalho regularmente (KUROZAWA; PAVAN, 2005). Além disso, a alternância de períodos úmidos e secos com frequência aparenta favorecer a doença (CABRAL, 2012; TÖFOLI; DOMINGUES; FERRARI, 2015).

Em virtude das condições brasileiras de cultivo, a doença tornou-se uma das mais destacadas devido ao alto potencial destrutivo que representa à cultura. Incide sobre praticamente todas as partes da planta, em folhas, hastes, pecíolos e frutos e por esta razão são observados prejuízos econômicos elevados (TOLEDO et al., 2009).

A doença se manifesta com sintomas de lesões menores nas folhas jovens e mais pronunciadas nas folhas mais velhas, apresentando aspecto necrótico de coloração pardo-escuras. As nervuras atingidas degradam-se e provocam o bloqueio da passagem da seiva, ocasionando amarelecimento e morte da parte atingida. Nos frutos causa lesões escuras, que em condições de alta umidade ficam recobertas pela frutificação do fungo, caracterizado pelo aspecto aveludado e de cor preta, conhecida como mofo preto (KUROZAWA; PAVAN, 2005).

A suscetibilidade à doença aumenta geralmente de acordo com a maturidade ou na fase reprodutiva da planta, na qual aumenta a demanda por açúcares. Estes são necessários para a formação dos frutos e novas brotações ao invés das folhas mais velhas, facilitando o processo de infecção em órgãos exportadores (TÖFOLI; DOMINGUES; FERRARI, 2015).

A severidade da doença resulta em intensa redução da área foliar e vigor das plantas, quebra de hastes, queda e depreciação de frutos e morte de plantas (VALE et al., 2000). De forma geral afeta a produtividade e qualidade de frutos, ocasionando consequentes prejuízos econômicos (DILL, 2009).

#### **4.2.2 Etiologia do patógeno**

Segundo Vale et al. (2000) o fungo *Alternaria solani*, agente causal da pinta preta foi confirmado como agente patogênico em 1896. Este fungo apresenta micélio septado e coloração escura, os conidiósporos são simples, alongados com conídios terminais (KUROZAWA; PAVAN, 2005).

A disseminação dos conídios ocorre essencialmente pela ação de insetos e do vento, além de sementes, pessoas e implementos agrícolas. O fungo também persiste em restos culturais, matéria orgânica e hospedeiros intermediários, por períodos prolongados e aptos a germinação (DILL, 2009; TÖFOLI; DOMINGUES; FERRARI, 2015).

A possibilidade de maior ocorrência da germinação dos conídios encontra-se entre uma extensa faixa de temperatura variando entre 6 a 34°, porém a temperatura considerada ótima situa-se entre 28°C a 30°C sob presença de água por 35 a 45 minutos. As lesões podem aparecer após 1 a 3 dias da inoculação do patógeno (KUROZAWA; PAVAN, 2005).

Visto que, uma vez presentes na cultura, ocorrendo umidade e calor suficientes, os conídios germinam e infectam as plantas rapidamente, podendo o fungo penetrar pela cutícula ou parede celular após a formação de apressório, por meio de ferimentos ou pelos estômatos. A colonização é intercelular, invadindo tecidos do hospedeiro e provocando alterações em diversos processos fisiológicos, que se manifestam na forma de sintomas (KUROZAWA, PAVAN, 2005; TÖFOLI, DOMINGUES, FERRARI, 2015).

O fungo manifesta ampla variação quanto a sua patogenicidade, no crescimento e na capacidade de esporulação em cultura. No entanto, os processos de formação dos esporos requerem alguns fatores estressantes, como a remoção dos esporos aéreos e exposição das colônias à radiação ultravioleta (PULZ, 2007).

### 4.3 PITANGUEIRA (*Eugenia uniflora* L.)

A pitangueira é uma planta dicotiledônea, nativa brasileira, pertencente ao gênero *Eugenia*, família Myrtaceae e espécie *Eugenia uniflora* L. É considerado um arbusto denso, com altura de aproximadamente de dois a quatro metros, copa arredondada, folhagem persistente ou semidecídua, raiz pivotante e profunda. As folhas quando maceradas exalam um odor característico, flores hermafroditas, o fruto é uma baga globosa, deprimida nos polos com sulcos marcados longitudinalmente, sendo frutos pequenos não ultrapassando 5,0 cm de diâmetro, doce apresentando leve acidez, aroma intenso e característico e coloração que vai do alaranjado a vermelho (BOURSCHEID et al., 2011).

As condições variadas de clima das diferentes regiões onde são cultivadas influenciam nas épocas de florescimento e frutificação da pitangueira. O desenvolvimento ideal da pitangueira é em regiões de clima quente e úmido, porém a cultura é capaz de tolerar baixas temperaturas, geadas, ventos e seca, apesar da frutificação ser prejudicada por este fator, resultando em queda dos frutos (LIRA Jr et al., 2007).

A espécie se encontra distribuída pelos estados da Bahia, Mato Grosso do Sul, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, e todo o sul do país, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (SOBRAL et al., 2015). Segundo Bourscheid et al. (2011) no que se refere à produção e comercialização do fruto da pitangueira, não há dados oficiais interno ou no exterior, porém estima-se que o maior produtor seja o Brasil.

A *Eugenia uniflora* L. é uma espécie que além de apresentar frutos comestíveis muito apreciados no Brasil, ainda tem aplicação na medicina popular na forma de chá de suas folhas, atuando principalmente como hipotensor, antigota, estomáquico e hipoglicemiante. O óleo essencial produzido pela planta possui composição variável de acordo com o momento da colheita, estação do ano ou estágio de maturidade antes da colheita (AURICCHIO, BACCHI, 2003).

### 4.4 ÓLEOS ESSENCIAIS

#### 4.4.1 Óleos essenciais no controle de doenças

Os óleos essenciais são produtos do metabolismo secundário das plantas, sendo compostos por misturas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas.



Apresentam propriedades biológicas, obtidos de partes das plantas, como folhas e frutos, através de destilação por arraste a vapor de água, destilação ou por solventes (MORAIS et al., 2009).

Os óleos essenciais são misturas consideradas muito complexas variáveis quanto aos seus constituintes (SALGADO et al., 2003). Apesar de apresentarem atividades biológicas sobre os mais diversos microrganismos, pouco se sabe a respeito de seus mecanismos de ação (GUIMARAES et al., 2011), no entanto Piper et al. (2001) afirmam que muitas vezes a ação dos óleos essenciais e suas substâncias em contato com as membranas celulares dos fungos, promovem a permeabilidade e causam vazão dos seus constituintes.

Os óleos essenciais extraídos de plantas medicinais e aromáticas obtidos da flora nativa apresentam grande potencial no controle de fitopatógenos, devido à sua ação antifúngica direta, inibindo o crescimento micelial e a germinação de esporos ou pela indução de fitoalexinas (OOTANI, 2010). Além de propriedades antifúngicas, ainda apresenta propriedades antibacterianas e inseticidas e baixo risco de toxicidade ao homem e ao meio ambiente (TOMAZONI, 2013).

O controle de doenças em plantas, com base no uso de óleos essenciais tem grande utilidade prática, já que estas substâncias são geralmente de fácil obtenção a baixo custo. São na maioria sistêmicos e de fácil degradação, pouco ou não fitotóxicos e não apresentam toxidez residual (MORAIS et al., 2009).

Os óleos essenciais são considerados fontes naturais para o desenvolvimento de novos produtos. Porém, grande parte da flora brasileira ainda não foi estudada, tornando-se uma alternativa promissora para estudos e descobertas de novos compostos químicos, a partir dessas plantas uma alternativa de controlar o desenvolvimento de fitopatógenos (STANGARLIN et al., 1999).

A busca por novos compostos que apresentem função antifúngica de origem vegetal demonstra relevante significância. A partir de estudos realizados foi possível observar o potencial antibiótico que os produtos vegetais possuem e avaliada a possibilidade de aplicação destes na prevenção e tratamento de doenças de origem fúngica (LIMA et al., 2006).

Em estudos realizados por Lobato et al., (2007) o óleo essencial de pimenta-de-macaco (*Piper aduncum* L.) em diferentes concentrações, mostrou-se eficaz no combate de fungos prejudiciais a sementes de feijão caupi (*Vigna unguiculata* L.) atuando como inibidor de colônias fúngicas.

Em ensaios realizados por Lima et al., (2006) para a determinação da Concentração inibitória mínima dos óleos essenciais de *Cinnamomum zeylanicum*, *Citrus limon*, *Eucalyptus*

*citriodora*, *Eugenia uniflora*, *Peumus boldus* e *Rosmarinus officinalis*, os autores observaram que todos estes apresentaram efetividade de inibição de pelo menos uma cepa fúngica de diversas espécies de *Candida*.

#### 4.4.2 Óleo essencial de pitanga (*Eugenia uniflora* L.)

O óleo essencial de pitanga ainda é pouco explorado para o controle de doenças em plantas, no entanto é bastante utilizado em ensaios sob fungos e bactérias principalmente referente à saúde. Em estudos realizados por Pessini et al. (2003) avaliando 13 diferentes plantas utilizadas no tratamento de doenças infecciosas pela medicina popular, obtendo destaque entre elas a espécie *Eugenia uniflora*, inibindo o desenvolvimento de algumas cepas de bactérias e fungos.

O óleo essencial de pitanga foi utilizado em estudos desenvolvidos por Brun e Mossi (2010), os quais obtiveram que as bactérias *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Xanthomonas campestris* apresentaram atividade antimicrobiana. Neste estudo, algumas bactérias se mostraram sensíveis a este óleo essencial, indicando um potencial de uso desta planta.

Segundo Auricchio et al. (2007) o extrato hidroalcoólico de folhas de *Eugenia uniflora* apresenta tanto atividades antimicrobianas, quanto antioxidantes *in vitro*. Estas atividades podem ser consideradas de origem dos compostos fenólicos. Neste contexto, com base nos resultados obtidos em ensaios, Bezerra et al. (2012) constataram a atividade antibacteriana produzida pelo extrato hidroalcoólico de folhas da *Eugenia uniflora* em cepas *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Drumond et al. (2004) observaram a ação do óleo essencial da folha da *Eugenia uniflora* L. *in vitro* sobre bactérias cariogênicas. Ocorreu inibição do crescimento do *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus casei*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguis* e *Streptococcus sobrinus* em diferentes concentrações.

No trabalho desenvolvido por Oliveira et al. (2009) foi avaliado a eficácia do uso de spray de óleo essencial de pitanga na descontaminação de escovas dentárias contaminadas pelo *Streptococcus mutans* após seu uso pelos participantes. O resultado obtido demonstrou significante redução de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) de *S. mutans* em relação ao controle negativo.

Em estudos realizados por Aquino et al. (2004), avaliou-se a atividade antifúngica de diversos óleos essenciais *in vitro*. O óleo essencial de *E. uniflora* a 2% obteve destaque inibindo 100% das cepas de dermatófilos (fungos que causam infecções em animais e humanos).

Em estudos realizados por Adebayo e Globalate (1994), para a proteção de sementes de feijão-caupi contra o ataque de *Callosobruchus maculatus* F. no armazenamento foram utilizados tanto pó de folhas, quanto óleo, incluindo as espécies *Lippia adoensis* Hoschs, *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf, *Lantana camara* L., *Eugenia uniflora* L.. A eficiência obtida foi em ordem decrescente.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia na Universidade Federal da Fronteira Sul, *Campus* Laranjeiras do Sul e casa de vegetação da mesma Universidade.

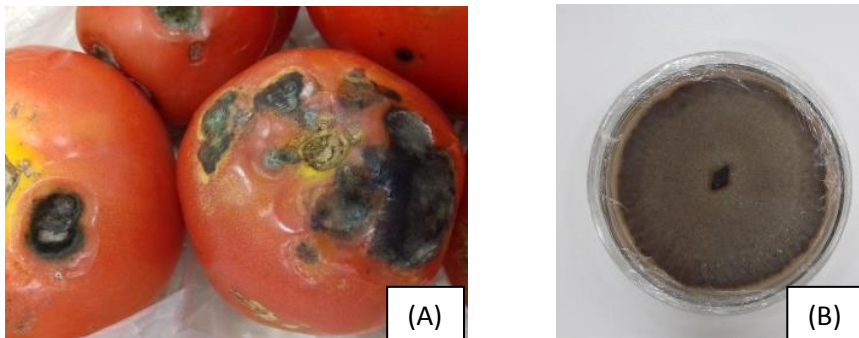
### 5.1 OBTENÇÃO DO FITOPATÓGENO E DO ÓLEO ESSENCIAL

O fungo foi obtido de frutos de tomate naturalmente infectadas e apresentando sintomas da doença pinta preta (Figura 1 (A)) e isolado no laboratório de Fitopatologia. O isolamento foi realizado em meio de cultura batata dextrose ágar (BDA). Posteriormente, para o preparo da suspensão de conídios, o fungo foi cultivado em meio BDA, em placa de Petri, por um período de setedias, em câmara de BOD, a 25 °C, em escuro.

Para estimular a esporulação do fungo *A. solani*, foi necessário promover um estresse ao fungo pela raspagem da colônia (Figura 1(B)), em seguida, procedendo-se a exposição da placa de Petri contendo o meio de cultura e o fungo em água corrente por 20 minutos, e incubação por 24 horas. A suspensão de conídios utilizada nos experimentos foi ajustada para  $1 \times 10^4$  conídios mL<sup>-1</sup>, obtida de colônias com sete dias de cultivo.

O óleo essencial de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) utilizado no experimento foi obtido já extraído, de produção comercial da região de Ponta Grossa-PR. Para obter diferentes concentrações do óleo essencial, esse foi diluído em água destilada contendo Tween-20 a 0,1%. Água destilada contendo Tween 20 a 0,1% foi utilizada como testemunha.

Figura 1 - Sintomas de pinta preta em frutos e tomateiro (A) e isolado de *Alternaria solani* em meio de cultura BDA (B)



Fonte: Elaborado pelo autor

## 5.2 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

Inicialmente foi avaliado o efeito do óleo essencial sobre o crescimento micelial do fungo. Para tanto, o óleo essencial foi diluído em água destilada com Tween 20 na proporção de 0,1% e adicionado ao meio de cultura BDA, antes de verter em placas de Petri. A repicagem para o meio BDA, contendo os tratamentos, foi feita pelo corte e retirada de discos de 0,5cm de diâmetro de colônias com sete dias de idade e transferidos para o centro das placas. Após as repicagens, as placas foram vedadas com filme plástico de PVC, devidamente identificadas e mantidas em câmara tipo BOD, em ambiente escuro, à temperatura de 25° C por 10 dias.

A avaliação foi realizada por medição dos diâmetros (mm) das colônias em dois sentidos perpendiculares entre si, tomando-se como valor de crescimento a média das duas medidas. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com 5 repetições, sendo cada repetição representada por uma placa. Constituíram tratamentos as concentrações de 0; 0,01; 0,05; 0,1; 0,5 e 1% do óleo essencial.

Para avaliar o efeito direto do óleo essencial de pitangueira sobre *A. solani* também foi realizado teste de germinação de esporos. O experimento foi realizado em placa de Elisa, na qual, em cada célula foi depositado 35  $\mu$ L da suspensão de conídios ( $1 \times 10^4 \mu$ L) e 35  $\mu$ L de cada tratamento. A placa de Elisa foi envolta em filme de PVC e acondicionada em câmara BOD, permanecendo por 20 horas a 25°C em escuro. Após esse período de incubação, a germinação dos conídios foi paralisada com azul de algodão de lactofenol e, em seguida contados 50 conídios com auxílio de microscópio óptico e avaliada a porcentagem de germinação destes. Também foi determinado o tamanho médio dos tubos germinativos

através da medição do tubo germinativo de dez esporos representativos de cada parcela, foi utilizado para observação o microscópio óptico e considerado os tamanhos de tubos germinativos de 1 vez o tamanho do próprio conídio e 2 vezes o tamanho do conídio. Constituíram tratamentos as concentrações de 0; 0,01; 0,05; 0,1; 0,5 e 1% do óleo essencial.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com cinco repetições, sendo cada repetição constituída de uma célula da placa de Elisa. Foram considerados germinados conídios com tubo germinativo maior ou igual ao menor diâmetro do esporo.

### 5.3 PROTEÇÃO DE PLANTAS

Para avaliar o efeito protetor *in vivo*, foi realizado bioensaio em casa de vegetação, esta com sistema de resfriamento e umidificação ligados. Apresentando temperatura entre 25°C e 28°C e irrigação por aspersão a cada cinco horas, durante três minutos. Para tanto, sementes de tomateiro cv. Super Marmande (Gaúcho/Maçã), foram semeadas em vasos com capacidade de um litro contendo mistura de solo, matéria orgânica e areia, nas proporções de 2:1:1 v/v. Após 45 dias da semeadura os tratamentos foram aplicados por aspersão na primeira folha composta. Três dias após foi realizada a inoculação com a suspensão de conídios ( $1 \times 10^4$ ), sendo pulverizada a primeira folha composta (tratada) bem como na segunda folha composta (não tratada), sendo mantidas em câmara úmida por 20 horas (Figura 2). Sete dias após a inoculação foi realizada a contagem do número de lesões em cada folha composta.

Figura 2 - Plântulas de tomateiro na implantação do experimento em casa de vegetação (A) e plantas pulverizadas e submetidas à câmara úmida após inoculação com *Alternaria solani* (B).



Fonte: Elaborado pelo autor

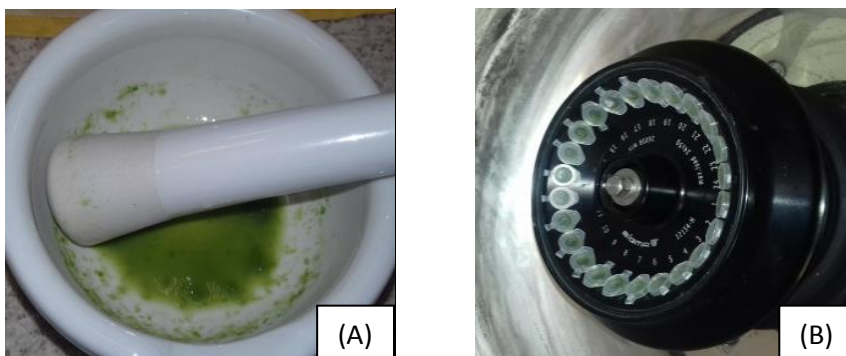
O delineamento experimental foi de blocos casualizados, com cinco repetições. O óleo essencial foi utilizado nas concentrações de 0; 0,01; 0,05; 0,1; 0,5% em 0,1% de Tween 20.

#### 5.4 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Para avaliação da atividade de mecanismos relacionados à defesa, foi conduzido experimento nos moldes do anterior. No entanto, nesse caso, as plantas não foram inoculadas pelo patógeno. Foram coletados dois folíolos de cada folha composta, tratada e não tratada de cada repetição, 72 horas após a aplicação dos tratamentos. Os folíolos coletados foram rapidamente congelados e mantidos a  $-20^{\circ}\text{C}$  para realização de análises bioquímicas.

Para tanto, as amostras de tecido foliar, coletadas e armazenadas conforme descrito anteriormente, foram maceradas em 4 mL de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0) contendo 1% (p/p) de PVP (polivinil-pirrolidona), em almofariz de porcelana. O homogeneizado foi centrifugado a  $14.500g$  durante 20 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante obtido, considerado como extrato enzimático, foi utilizado para a determinação do conteúdo de proteínas, carboidratos e atividades enzimáticas de peroxidase, polifeniloxidase e fenilalanina-amônia-liase (Figura 3). Todo o material empregado foi mantido sob refrigeração.

Figura 3 - Tecido foliar de tomateiro macerado (A) e centrifugação do homogeneizado (B), sob condições refrigeradas



Fonte: Elaborado pelo autor

O conteúdo de proteínas totais foi determinado pelo método de Bradford (1976). Para isso, foram homogeneizados  $600\ \mu\text{L}$  de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0),  $200\ \mu\text{L}$  do extrato enzimático e  $200\ \mu\text{L}$  de reagente de Bradford (250 mg de corante Coomassie Brilliant Blue G-250, 125 mL de ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) e 125 mL de água destilada). A determinação do conteúdo de proteínas foi realizada através da leitura da absorbância a 595 nm em

espectrofotômetro. Cada amostra foi formada por três réplicas. A cubeta de referência foi constituída de 800  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0) e 200  $\mu\text{L}$  do reagente. A absorbância foi plotada em curva padrão para proteína. Os resultados foram expressos em  $\text{mg proteína}^{-1} \text{ mL amostra}^{-1}$ .

A atividade de Peroxidases nas amostras foi determinada conforme metodologia proposta por Lusso e Pascholati (1999). Para tanto, a mistura de reação foi constituída de 0,2 mL de extrato protéico e 2,8 mL do substrato para enzima (306  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrogênio P.A., 12,5 mL de guaiacol a 2% e 87,5 mL de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0)). A reação foi conduzida a 30°C por dois minutos. A atividade foi determinada pela variação ocorrida entre os valores extremos situados na faixa de incremento linear. Os resultados foram expressos em unidades de absorbância a 470 nm  $\text{min}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$ .

A atividade das Polifenoloxidasas foi determinada conforme a metodologia proposta por Duangmal e Apenten (1999). Para tanto, o substrato para enzima foi composto por catecol, na concentração de 20 mM, dissolvido em tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 6,8). A reação foi conduzida misturando-se 900  $\mu\text{L}$  do substrato e 100  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático seguida de leituras em espectrofotômetro, a 420 nm. As leituras foram realizadas de forma direta por um período de 1 min. Os resultados foram expressos em absorbância  $\text{min}^{-1} \text{ mg de proteína}^{-1}$ .

A atividade de Fenilalanina amônia-liase foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Umesha (2006), na qual 100  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático foram acrescidos de 400  $\mu\text{L}$  de tampão Tris-HCl 0,025 M (pH 8,8) e 500  $\mu\text{L}$  de solução de L-fenilalanina 0,05 M (825,9 mg diluído em 100 mL de tampão Tris-HCL 0,025 M (pH 8,8)). Esta mistura permaneceu incubada por 2 h, a 40°C. Após, foram adicionados 60  $\mu\text{L}$  de HCl 5 M para cessar a reação, seguido de leitura em espectrofotômetro a 290 nm. A atividade de fenilalanina amônia-liase consistiu da diferença entre a absorbância da mistura contendo amostra e do controle (100  $\mu\text{L}$  de extrato enzimático e 900  $\mu\text{L}$  de tampão Tris-HCl 0,025 M (pH 8,8)), a qual foi plotada em curva padrão para ácido trans-cinâmico e expressa em  $\text{mg de ácido transcinâmico h}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$ .

Os açúcares redutores formados foram quantificados utilizando o método de Lever (1972). Para tanto, foi retirada uma alíquota de 50  $\mu\text{L}$  dos tubos incubados e adicionado 1,5 mL de solução de hidrazida do ácido *p*-hidroxibenzoico (PAHBAH) 0,5% em NaOH 0,5 M. Esta mistura foi mantida a 100°C durante 10 min e após resfriada em banho de gelo. A leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro a 410 nm, extraíndo-se os valores de absorbância do branco. A quantidade de açúcares foi determinada utilizando-se curva-padrão

de concentrações de glicose e os valores expressos em equivalente mg de glicose h<sup>-1</sup> mg proteína<sup>-1</sup>.

## 5.5 ANÁLISE DOS DADOS

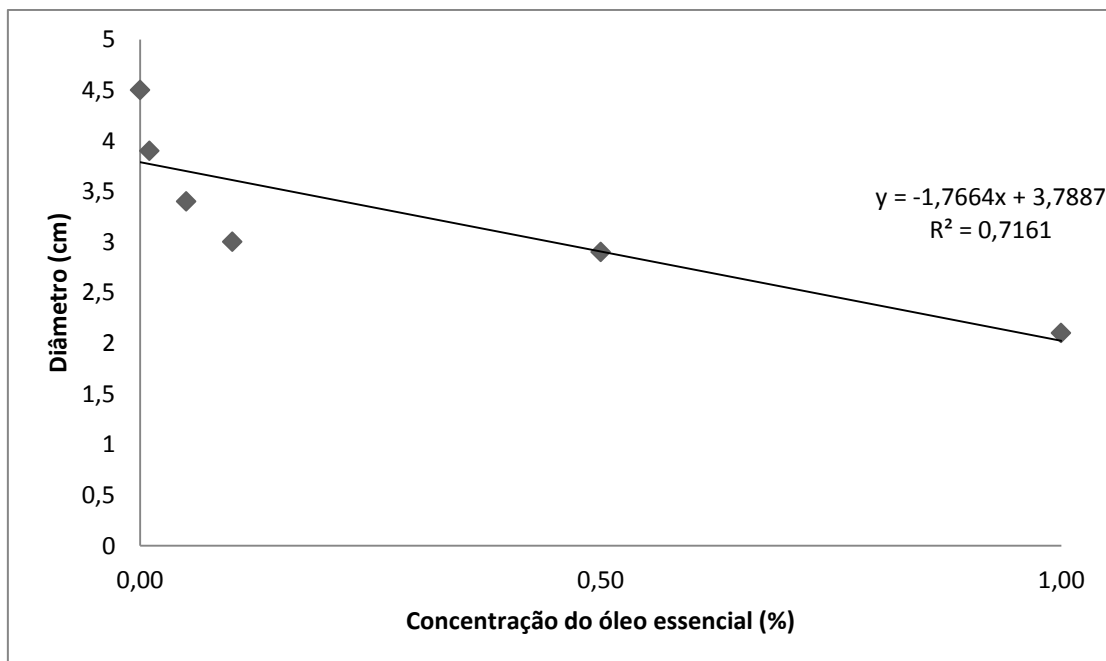
Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e análise de regressão utilizando os programas Sisvar (FERREIRA, 2008) e Excel.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

O crescimento micelial de *A. solani* foi reduzido com o aumento na concentração do óleo essencial de pitanga (Figura 4), indicando efeito dose-dependente. A redução do crescimento micelial entre as concentrações 0,01%; 0,05%; 0,1%; 0,5% e 1% foi de 13%; 24%; 33%; 35% e 54% respectivamente, em relação a testemunha.

FIGURA 4 - Crescimento micelial de *Alternaria solani* sob diferentes concentrações de óleo essencial de pitangueira.



Fonte: Elaborado pelo autor



Esses resultados indicam o efeito fungistático do óleo essencial de pitangueira sobre o agente causal da pinta preta do tomateiro, ou seja, não cessou completamente o crescimento micelial do fungo, no entanto reduziu o crescimento.

Em estudos com outros óleos essenciais, Abreu (2006) observou que entre as concentrações 0 a 1000  $\mu\text{L/L}^{-1}$ , dos óleos essenciais das espécies *Rosmarinus officinalis*, *Citrus limon*, *C. sinensis* e *Corymbia citriodora* não inibiram o crescimento micelial, mas que houve diminuição da incidência da pinta preta, com os óleos essenciais *Cymbopogon citratus* e *Syzygium aromaticum*.

Em estudos realizados por Inácio et al. (2009) utilizando óleo essencial de alfavaca, foi demonstrado o potencial deste óleo no controle do desenvolvimento de *Fusarium* sp. E *Macrophomina*, inibindo completamente o seu desenvolvimento. Além deste outros óleos essenciais foram utilizados para estudo, sendo realizado tratamento com óleo essencial de erva-cidreira, capim-cidreira, citronela e canela e o tratamento padrão com Carbendazim + Thiram, sendo que todos inibiram por completo o crescimento micelial dos fungos *Phomopsis phaseoli* var. *sojae*, *Fusarium* sp. e *Macrophomina phaseolina*.

Tomazoni et al. (2013) em testes realizados *in vitro* com o óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum* contra os fungos *Alternaria solani*, *Stemphylium solani* e *Septoria lycopersici*, verificaram a inibição do crescimento de *A. solani* e *S. solani* a partir da concentração 0,5  $\mu\text{L/mL}$  e para *S. lycopersici* a partir da concentração 0,1  $\mu\text{L/mL}$ . Santos Neto et al. (2016), também obtiveram resultados satisfatórios quanto a inibição do crescimento micelial de *Alternaria solani* e *Septoria lycopersici*, utilizando extrato aquoso, óleo essencial e citral provenientes do capim-limão (*Cymbopogon citratus*), sendo que o óleo essencial e o citral na maior concentração testada ( $400\mu\text{L}^{-1}$ ) proporcionaram 100% de inibição, demonstrando potencial alternativa para manejo fitossanitário da cultura do tomate.

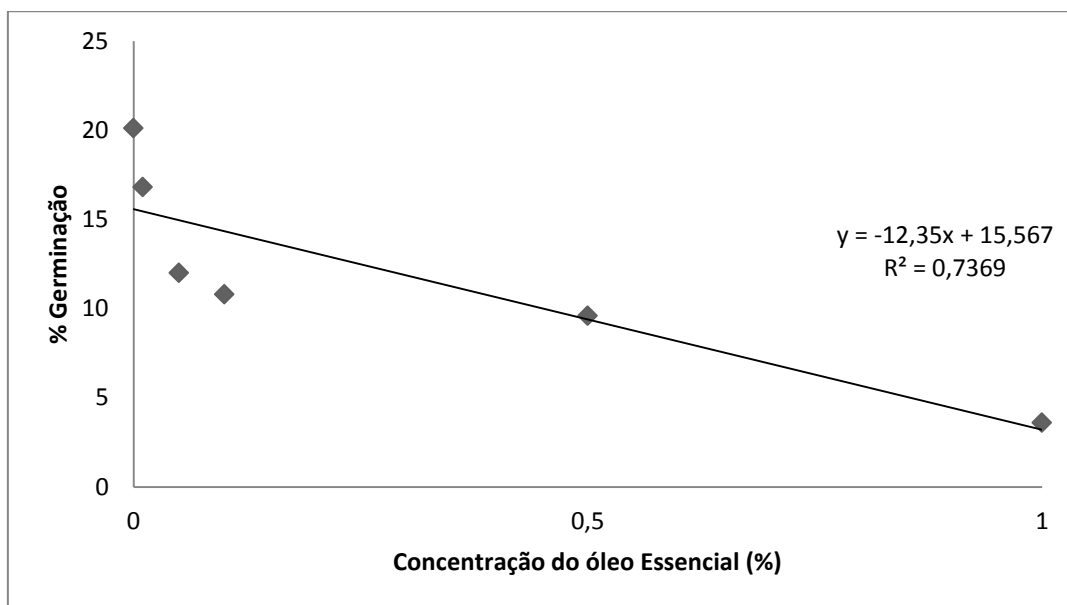
Em morangueiro Almeida, Camargo e Panizzi (2009) observaram que o extrato de fumo, arruda e alho exercem controle sobre o desenvolvimento micelial do patógeno, *Colletotrichum acutatum*.

Ogbebor e Adekunle (2005) observaram redução tanto no crescimento micelial quanto na germinação de conídios de *C. cassicola*, isolado de seringueira, sob concentrações de extrato bruto (10, 25, 50 e 100%) de *Ocimum basilicum*. Assim como, Bonaldo et al. (2007) que observaram que o óleo essencial de *Corymbia citriodora* em alíquotas testadas de 5, 10, 20; 40 e 60  $\mu\text{L}$ , sendo que todas apresentaram ação inibitória no crescimento micelial e germinação de conídios de *Alternaria alternata*, *Colletotrichum sublineolum* e escleródios de *Sclerotium rolfsii*.

Em relação à germinação dos esporos de *A. solani* obtida entre as concentrações 0,01%; 0,05%; 0,1%; 0,5% e 1% obteve-se redução de 16%; 40%; 46%; 52% e 82% respectivamente, em relação à testemunha.

A porcentagem de germinação de esporos do fungo foi reduzida com o aumento na concentração do óleo essencial de pitanga (Figura 5), indicando que o óleo essencial também tem efeito direto sobre a germinação de esporos, sobretudo em maiores concentrações.

FIGURA 5 - Porcentagem de germinação de conídios de *Alternaria solani* sob diferentes concentrações de óleo essencial de pitangueira



Fonte: Elaborado pelo autor

Com base em ensaios *in vitro* realizados, Becker (2005) obteve resultados satisfatórios em relação a atividade antimicrobiana apresentada pelo extrato de *C. citratus*, inibindo o crescimento micelial do fungo *Cercospora kikuchii* em soja.

Em estudos realizados por Almeida, Camargo e Panizzi (2009) para o controle de *Colletotrichum acutatum* em morangueiro, foram testados os extratos de plantas medicinais, das quais arruda, gengibre, vinca, losna, cebola, arnica e nim foram os que propiciaram melhor inibição da germinação dos conídios, diferindo estatisticamente da testemunha.

Testes *in vitro* foram realizados por Töfoli, Domingues e Kurozawa (2003) visando avaliar a ação inibitória fungicidas sobre o crescimento micelial e germinação de conídios de *Alternaria solani*, sendo os quais Kresoxim methyl, azoxystrobin, pyraclostrobin+methiram, fenamidone e famoxadone+mancozeb apresentaram comportamento inibitório intermediário

com relação ao crescimento micelial e inibição completa da germinação de conídios a partir de  $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

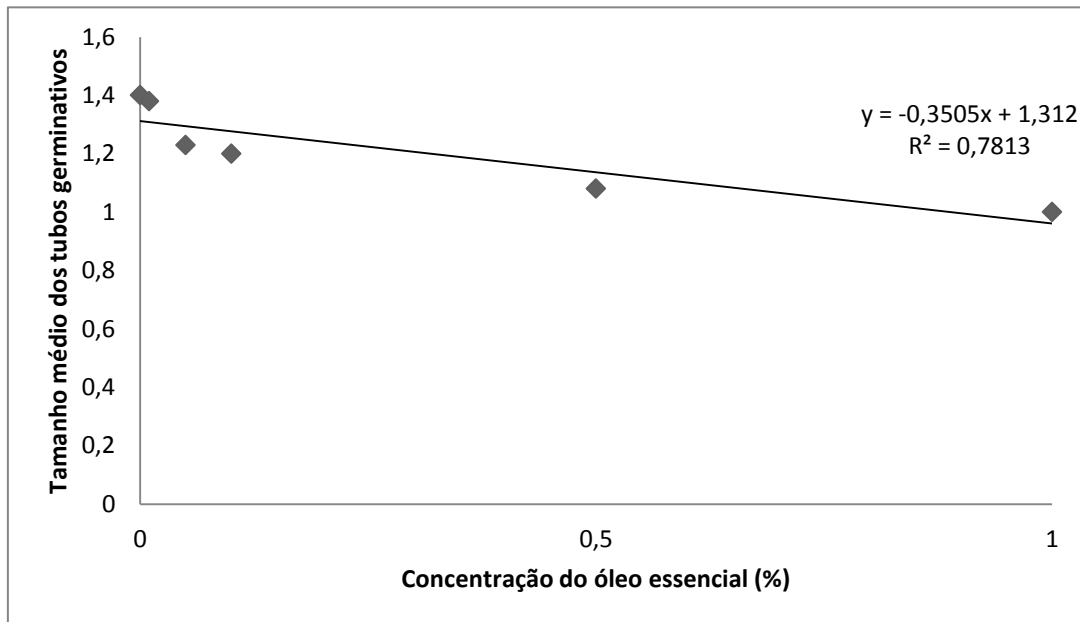
Itako et al. (2008) em ensaios para determinação da atividade antifúngica de extrato bruto aquoso de plantas medicinais em tomateiro utilizando o extrato de *A. camphorata*, a porcentagem de germinação foi de 79% a partir da concentração 1% e de 21,5% na concentração 40%. Já para os extratos de *C. citratus* e *R. officinalis* a 20% e 40% os resultados obtidos foram: 63,3 e 39,1; 59,5 e 38,5% de germinação, respectivamente.

Em estudos realizados por Rodrigues et al. (2007) resultados indicam atividade antimicrobiana de extratos bruto aquoso de gengibre, inibindo o crescimento micelial e a produção de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* em alface.

Quanto ao tamanho médio dos tubos germinativos de *A. solani*, foi observado resultado semelhante, com inibição no tamanho das hifas com o aumento na concentração do óleo essencial de pitanga aplicado (Figura 6), indicando efeito fungistático do óleo essencial sobre esse fitopatógeno. Esse resultado está pertinente com os observados para germinação e crescimento micelial, mostrando efeito não apenas na germinação como também no crescimento das hifas.

No trabalho desenvolvido por Fiori et al. (2000) foi observado o efeito fungitóxico do óleo essencial de *A. millefolium* em *Didymella bryoniae* sendo que, na alíquota de  $100 \mu\text{L}$ , foi identificada inibição de 96% da germinação de conídios, além disso observaram também através de microscopia eletrônica de varredura, crescimento atípico e degeneração das hifas de *D. bryoniae*.

FIGURA 6 - Tamanho médio de tubos germinativos de *Alternaria solani* sob diferentes concentrações de óleo essencial de pitangueira



Fonte: Elaborado pelo autor

## 6.2 PROTEÇÃO DE PLANTAS

Para o número de lesões de pinta preta em plantas de tomateiro, verificou-se a redução de incidência da doença tanto em folhas tratadas como em não tratadas, com resultados mais expressivos em folhas tratadas (Figura 7). Assim, embora predomine efeito local também houve efeito sistêmico. Quanto às concentrações utilizadas, observou-se que mesmo em menores concentrações do óleo essencial, como a 0,01% já houve redução drástica no número de lesões.

Embora ainda sejam poucos estudos de uso de óleos essenciais no controle alternativo dessa doença, no trabalho desenvolvido por Abreu (2006) também foi observada tendência de diminuição da incidência da doença, com os óleos essenciais *C. citratus* e *S. aromaticum* na avaliação de folíolos doentes.

Balbi-Penã et al., (2006) verificaram que a utilização de extrato bruto de cúrcuma resulta em uma opção para controle de pinta preta em cultivos orgânicos de tomate, coincidindo com níveis de severidade e produtividade similares aos obtidos com fungicidas cúpricos.

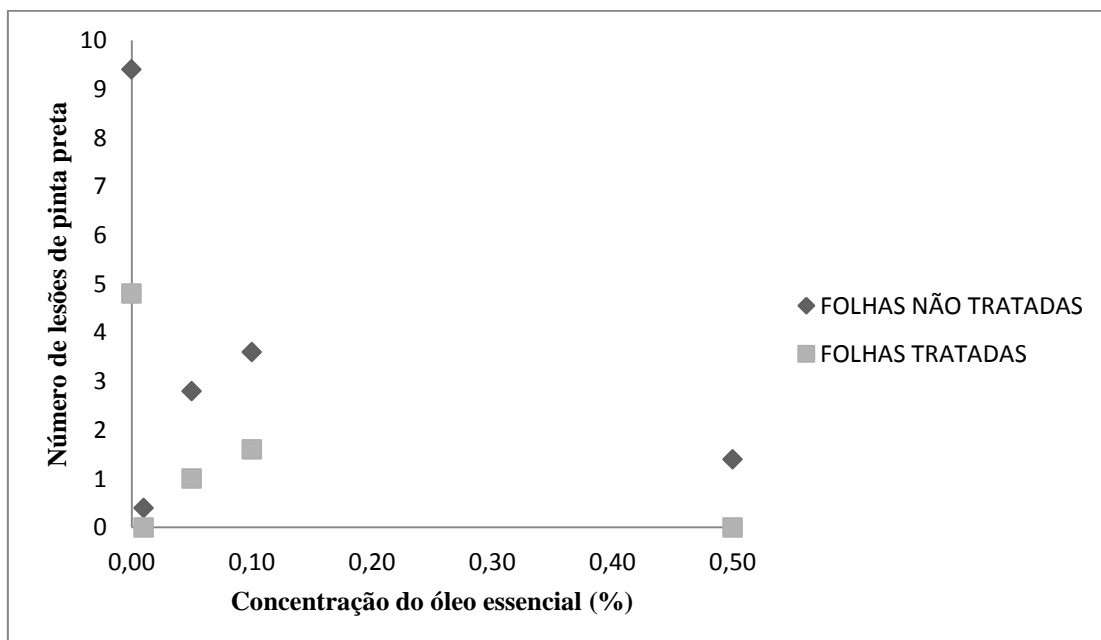
Os resultados de incidência dos patógenos identificados em pós-colheita no morango, *Rhizopus* sp., *Penicillium* sp. e *Botrytis* sp, revelaram que os extratos de losna e alho

apresentaram eficiência superior a 90% em estudos realizados por Almeida, Camargo e Panizzi (2009).

No trabalho desenvolvido por Itako et al., (2008) o número de lesões no primeiro par de folhas de tomateiro não diferiu estatisticamente da testemunha, observando a ausência de proteção local, no entanto, no segundo par de folhas, que não recebeu tratamento, todos os extratos bruto aquosos de *Achillea millefolium*, *Artemisia camphorata*, *Cymbopogon citratus* e *Rosmarinus officinalis* utilizados diferiram estatisticamente da testemunha, apresentando número de lesões inferior, a partir disso, pode-se verificar uma translocação sistêmica dos extratos.

Filtrado de micélio de *Rhizopus* sp. (FMR), quitosana de *Rhizopus* sp. (QMR) e *Trichoderma* sp. (QMT), extratos de casca in natura e seca de maracujá e extrato metanólico de casca seca de frutos de maracujá (MMS) foram utilizados em estudos por Pereira et al. (2008), obtendo reduções da murcha de verticílio em cacauero. Os extratos FMR, QMT, MMS e QMR apresentaram reduções em 22,8, 20,1, 19,2 e 15,7% respectivamente, em relação à testemunha, reduzindo a severidade da doença.

Figura 7 - Número de lesões de pinta preta (*Alternaria solani*) em plantas de tomateiro tratadas diferentes concentrações de óleo essencial de pitangueira.



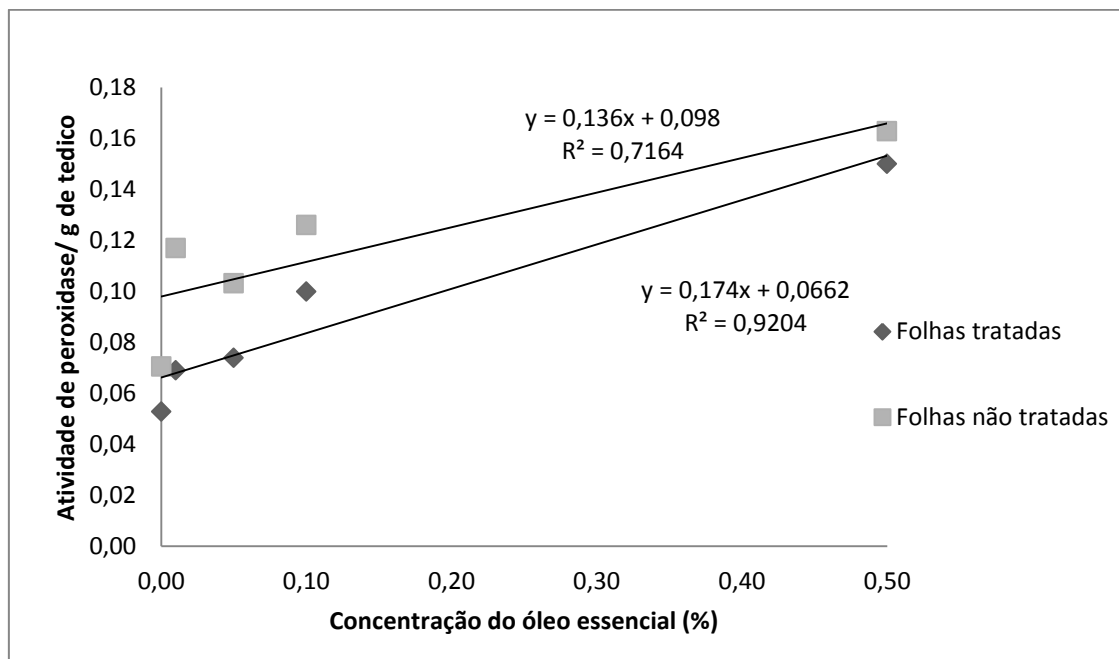
Fonte: Elaborado pelo autor

### 6.3 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Em relação aos mecanismos de defesa da planta foram analisadas atividades de peroxidases, polifeniloxidase, fenilalanina amônia-liase, proteínas totais e carboidratos.

Quanto à de peroxidases, houve incremento na atividade dessa enzima com o aumento na concentração do óleo essencial utilizada, apesar da atividade em folhas não tratadas apresentar maiores resultados em relação às folhas tratadas, indicando efeito local e também sistêmico do óleo essencial (Figura 8).

Figura 8 - Atividade de peroxidase em folhas de tomateiro tratadas com óleo essencial de pitanga e folhas não tratadas.



Fonte: Elaborado pelo autor

A atividade de peroxidase está associada a uma variedade de processos relacionados à defesa em plantas, incluindo reações de hipersensibilidade, suberização e lignificação (SILVA et al., 2007).

Becker (2005) constatou em ensaios realizados que para atividade de peroxidase, *R. Officinalis* e *C. longa* (5%) resultaram em valores estatisticamente diferentes da testemunha, porém inferiores, indicando que apesar da redução da severidade de doenças de final de ciclo e oídio em soja com os extratos de *C. longa*, *C. citratus* e *R. officinalis*, provavelmente não haja relação com alguma ativação ou indução da atividade de peroxidases e pode ser que

outros mecanismos de defesa da planta ou alguma atividade antimicrobiana direta, possam estar envolvidos no controle destas doenças, portanto estes extratos não envolvem a ativação de peroxidases de acordo com o autor.

Neste contexto, Di Piero e Pascholati (2004) em testes realizados em folhas de tomateiro, as análises bioquímicas realizadas mostraram que as peroxidases não são bons marcadores de resistência, pois não houve diferença no acúmulo dessas enzimas entre plantas tratadas com acibenzolar-S-metil, este considerado indutor de resistência altamente eficiente sobre o controle da bacteriose *Xanthomonas vesicatoria*.

Já, Roth *et al.* (2000) demonstraram que a aplicação de extrato aquoso de *Lychnis viscaria* em plantas de pepino induziu aumento da atividade de até 20% da peroxidase e 68% de  $\beta$ -1,3-glucanase, concluindo que este extrato induz mecanismos bioquímicos de resistência na planta. Na cultura da alface, verificou-se que enzima peroxidase na planta foi aumentada a partir da aplicação de massa de gengibre na base da planta e reduziu a incidência da doença *Sclerotinia sclerotiorum*, indicando controle da doença por atividade antimicrobiana direta ou pela ativação de mecanismos de defesa das plantas (RODRIGUES *et al.*, 2007).

O aumento significativo da concentração de peroxidases em plantas de tomateiro tratadas com indutores bióticos (*Bacillus subtilis*) e abióticos (*acibenzolar-S-metil*) e a ausência de controle das doenças no tratamento com pulverização direta de *B. subtilis* nas folhas, sugerindo uma relação entre o mecanismo de controle das doenças e a resistência induzida, foram os resultados obtidos por Araujo e Menezes (2009).

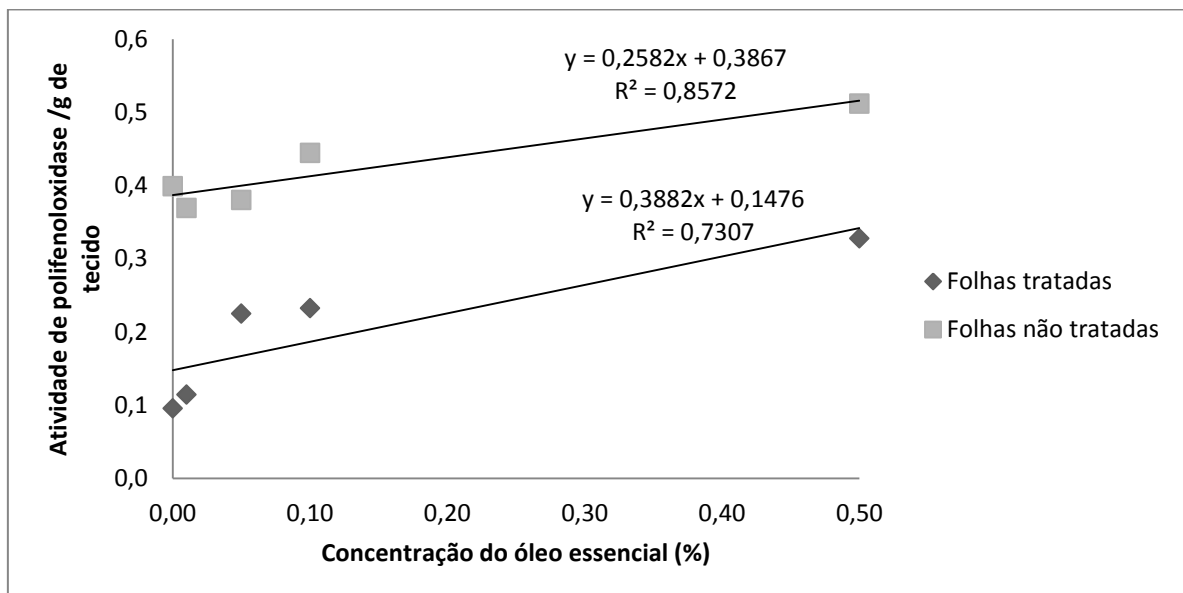
Estudos de Pereira *et al.*, (2008) demonstraram que paralelamente à redução da severidade da murcha-de-verticílio pela aplicação de filtrado de micélio de *Rhizopus* sp., houve aumento relativo das atividades das enzimas peroxidase e polifenoloxidase, sendo portanto um potencial indutor de resistência para manejo de murcha-de-verticílio em cacauero.

Com relação ao experimento com atividade de peroxidases, Peiter-Beninca *et al.*, (2008) constataram que os extratos diclorometânico para sorgo e soja e etanólico para soja inibiram a atividade enzimática. A atividade específica de peroxidase em soja foi inibida pelo extrato etanólico e induzida pelo hexânico, mas sem diferença do tratamento com ASM. Neste contexto constataram maior indução pelos extratos de *P. sanguineus* em cotilédones de soja do que em mesocótilos de sorgo, concluindo que esses resultados indicam o pequeno potencial destes extratos para a indução de resistência envolvendo sorgo e soja.

Quanto à polifenoloxidases, o óleo essencial de pitangueira também promoveu incremento linear na atividade, tanto em folhas tratadas como não tratadas (Figura 9). Esses

resultados indicam efeito local e também sistêmico desse óleo essencial. No entanto, maior efeito foi observado em folhas não tratadas. Como esse comportamento foi observado também para concentração de 0% (testemunha sem óleo essencial), é possível que outros fatores possam estar também envolvidos, como por exemplo, a idade e acúmulo de compostos diferenciado entre as folhas compostas. Esse efeito diferenciado é pertinente com o resultado de outros compostos bioquímicos avaliados, bem como com a severidade da doença apresentada anteriormente.

Figura 9 - Atividade de polifenoloxidase em folhas de tomateiro tratadas com óleo essencial de pitanga e folhas não tratadas.



Fonte: Elaborado pelo autor

A importância da atividade da polifenoloxidase na resistência a doenças de acordo com Campos et al. (2004) possivelmente tem relação com sua propriedade em oxidar compostos fenólicos para quinonas, sendo estes mais tóxicos aos microrganismos e também sua ação protetora no local do ferimento, neste contexto os autores constataram maior atividade da polifenoloxidase em tecidos infectados de cultivares resistentes do que em tecidos infectados de cultivares suscetíveis ou em plantas sadias.

A atividade da polifenoloxidase avaliada por Campos et al. (2004) foi significativamente maior em plantas de feijão tratadas com ácido salicílico e com o fungo indutor (raça delta de *Colletotrichum lindemuthianum*), antes e após a inoculação do patótipo virulento (33/95 de *C. lindemuthianum*). A cultivar de feijão resistente apresentou maior



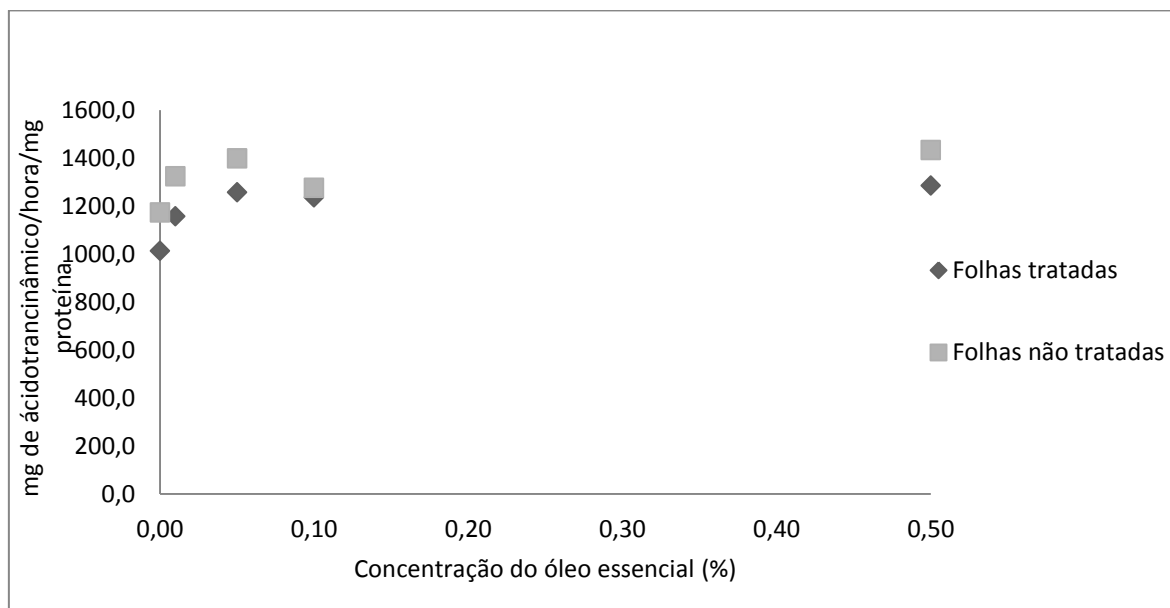
atividade desta enzima dentre as cultivares resistentes e susceptíveis testadas. No mesmo estudo a atividade de peroxidase mostrou resultado semelhante à polifeniloxidase.

Estudos de Cavalcanti et al. (2006) com plantas de tomateiro cv. Santa Cruz Kada pulverizadas com acibenzolar S-metil (0,2 g l<sup>-1</sup> ASM) e uma formulação natural proveniente de biomassa cítrica (Ecolife® 5 ml<sup>-1</sup>) e após quatro dias, inoculadas com um isolado patogênico de *Xanthomonas vesicatoria*, obtiveram resultados satisfatórios quanto à resistência induzida nestas plantas, sendo evidenciada pelo aumento da atividade de peroxidases e polifenoloxidasas, conferindo 47,7% e 39,2% de proteção respectivamente, em 12 dias de avaliação.

Guimarães (2013) observou em seus ensaios em plantas de tomate, maiores valores de polifenoloxidase, peroxidase e proteínas totais solúveis em folíolos de plantas pulverizadas com o produto piraclostrobina+metiram na dose 400g p. c./100L, sugerindo provável envolvimento nos mecanismos de indução de resistência na planta.

Para a enzima fenilalanina amônia-liase não foi observada diferença significativa pelo óleo essencial (Figura 10). É possível que a ação desse derivado da pitangueira não afete, ou afete pouco a atividade dessa enzima.

Figura 10 - Atividade de fenilalanina amonia-liase em folhas de tomateiro tratadas com óleo essencial de pitanga e folhas não tratadas.



Fonte: Elaborado pelo autor

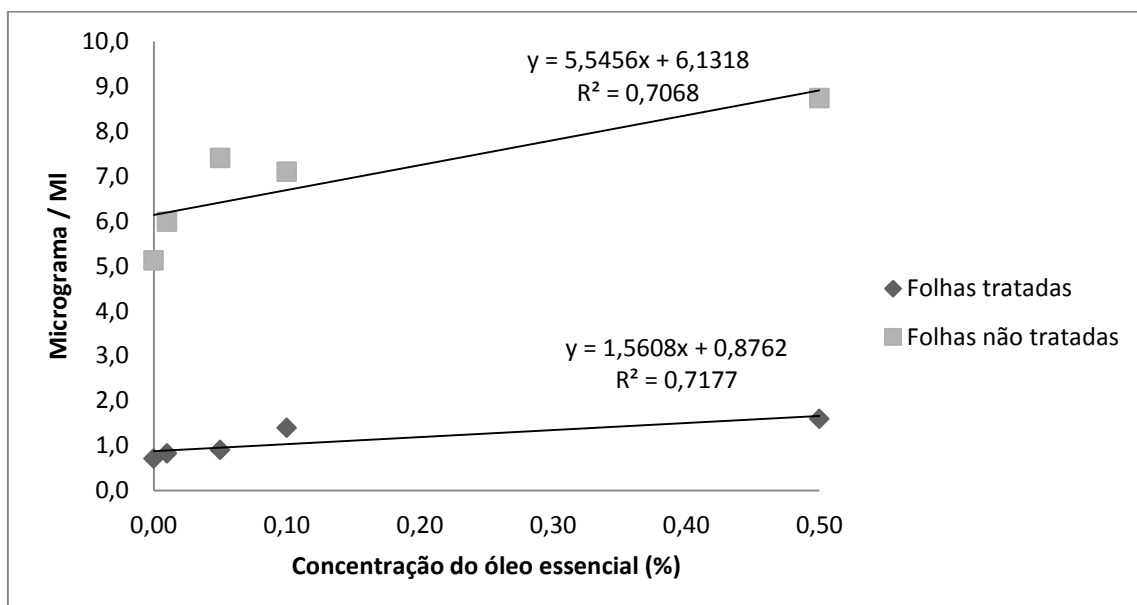
A enzima fenilalanina amônia-liase (FAL) é precursora da rota dos fenilpropanóides originando diversos outros compostos originados a partir do ácido benzóico, cumarinas, precursores de lignina, amônia e demais outros, utilizados pelas plantas para sua defesa (FORMENTINI, 2012).

Cavalcanti et al. (2006) observaram a tendência de queda nas atividades de fenilalanina amônia-liases a partir de 3 dias após as pulverizações com os tratamentos acibenzolar S-metil (0,2 g l<sup>-1</sup> ASM) e uma formulação natural proveniente de biomassa cítrica (Ecolife® 5 ml<sup>-1</sup>) em plantas de tomate.

Em estudos realizados Formentini (2012), não detectou atividade para a enzima fenilalanina amônia-liase em tomateiro, no entanto, obteve resultados de indução de peroxidase em tomateiro suscetível a *M. incognita* pelo *B. cereus*, já em tomateiro resistente o extrato de alecrim induziu as atividades de peroxidase e polifeniloxidasas.

Quanto a proteínas totais o efeito observado pode estar relacionado com maior síntese de compostos proteicos tanto em folhas tratadas ou não tratadas, apresentando maiores valores em folhas não tratadas (Figura 11). Esses compostos podem estar envolvidos na indução de defesa da planta estimulados pelo óleo essencial, considerando também demais fatores externos que podem estar influenciando no resultado.

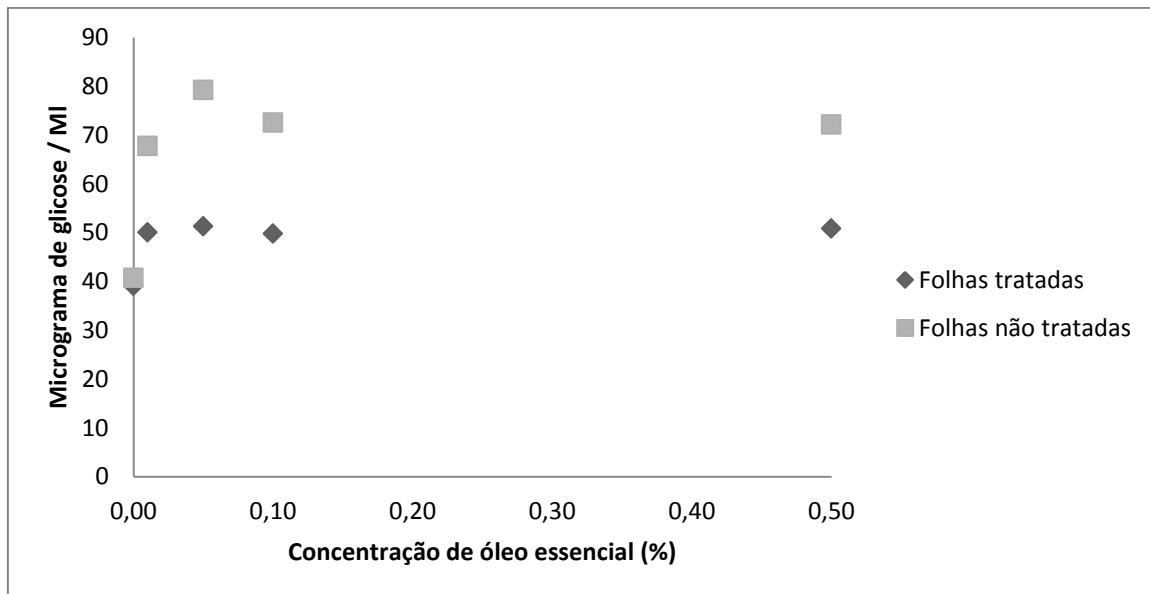
Figura 11 - Atividade de proteínas totais em folhas de tomateiro tratadas com óleo essencial de pitanga e folhas não tratadas.



Fonte: Elaborado pelo autor

Para carboidratos não foi observado efeito significativo, (Figura 14) o que demonstra que possivelmente a ação do óleo essencial de pitangueira não tenha influência ou influencie pouco a atividade dessa enzima.

Figura 14 - Atividade de carboidratos em folhas de tomateiro tratadas com óleo essencial de pitanga e folhas não tratadas.



Fonte: Elaborado pelo autor

Em testes realizados por Cavalcanti et al. (2006) com plantas de tomateiro, apenas plantas pulverizadas com ASM ( $0,2 \text{ g L}^{-1}$ ) manifestaram tendência de aumento de atividade de beta-1,3-glucanases entre 3 e 12 dias após a pulverização, ainda que as vezes não-significativas.

Em estudos desenvolvidos por Di Piero e Pascholati (2004) verificou-se que vários indutores bióticos e abióticos elevaram as atividades das  $\beta$ -1,3-glucanases e peroxidases em plantas de pepino, mas sem haver relação entre o aumento da atividade de uma enzima em particular e a indução de resistência, reforçando a ideia de que a resistência não depende somente de um fator.

Ramos et al. (2015) estudaram os efeitos fisiológicos da piraclostrobina, boscalida, reguladores vegetais e extrato vegetal no acúmulo de carboidratos durante o desenvolvimento de plantas de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) em condições de ambiente protegido. Obtiveram como resultados que a piraclostrobina e a boscalida aplicados tanto isolados, quanto combinados favoreceram o incremento de carboidratos nas folhas, caules e frutos de tomate.

## 7 CONCLUSÕES

O óleo essencial de pitangueira apresentou efeito antifúngico direto sobre *Alternaria solani* inibindo de forma linear o crescimento micelial, a germinação e o desenvolvimento de tubos germinativos. Também promoveu efeito indireto ocasionando aumento na atividade de peroxidases e polifenoloxidasas, com efeito local e sistêmico, no entanto pode ser observado efeito maior em folhas não tratadas, este fato pode estar relacionado aos compostos presentes nas folhas tratadas e não tratadas, já que estas apresentavam diferenças de idade. O óleo essencial de pitangueira apresentou efeito protetor em plantas de tomateiro à pinta preta reduzindo a severidade da doença, indicando potencial uso deste óleo essencial para controle da pinta preta em tomateiro.

## REFERÊNCIAS

- ABREU C. L. M. **Controle de *Alternaria solani* em tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) com óleos essenciais**. 2006. 82 f. Tese (Doutorado em Agronomia - Horticultura) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2006.
- ADEBAYO, T., GLOBALATE, A.A. Proteccion of stored cowpea from *Callosobruchus maculatus* using plant products. **Insect Science and its Application**, v.15, n.2, p.185-189, 1994.
- ALMEIDA, T. F., CAMARGO, M., PANIZZI, R. C. Efeito de extratos de plantas medicinais no controle de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da flor preta do morangueiro. **Summa Phytopathologica**, v.35, n.3, p.196-201, 2009.
- AQUINO, P. M. L. P. et al. **Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre dermatófitos isolados de *Tinea capitis* Laes & Haes**, 2004. v.25, n.150, p.200-12.
- ARAÚJO, F.F.; MENEZES, D. Indução de resistência a doenças foliares em tomateiro por indutores biótico (*Bacillus subtilis*) e Abiótico (Acibenzolar-S-Metil). **Summa Phytopathologica**, v.35, n.3, p.169-172, 2009.
- AURICCHIO, M. T., BACCHI, E. M. – Folhas de *Eugenia uniflora* L. (pitanga): propriedades farmacobotânicas, químicas e farmacológicas. Revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v.62, n.1, p.55–61, 2003.
- AURICCHIO, M. T., BUGNO, A., BARROS, S. B. M., BACCHI, E. M. Atividades Antimicrobiana e Antioxidante e Toxicidade de *Eugenia uniflora*. **Latin American Journal of Pharmacy**, São Paulo, v.26, n.1, p.76-81, out. 2007.
- BALBI-PEÑA, M.I., BECKER, A., STANGARLIN, J.R., FRANZENER, G., LOPES, M.C. & SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Controle de *Alternaria solani* em tomateiro por extratos de *Curcuma longa* e curcumina - II. Avaliação *in vivo*. **Fitopatologia Brasileira**, v.31, p.401-404. 2006.
- BECKER, Andrea. **Controle de doenças de final de ciclo e oídio da soja por extratos aquosos de *Cymbopogon citratus*, *Rosmarinus officinalis* e *Curcum longa* e solução de curcumina**. Marechal Cândido Rondon, 2005. 52p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Curso de graduação em Agronomia, Marechal Cândido Rondon, 2005.

BEZERRA, N. A., FELISMINO, D. C., CHAVES, T. P.; ALENCAR, L. C. P., DANTAS, I. C., COSTA SOBRINHA, L. Avaliação da atividade antimicrobiana de *Eugenia uniflora* L. **Revista de biologia e farmácia**, v.8, n.2, p.40-49, 2012.

BONALDO, S.M. et al. Contribuição ao estudo das atividades antifúngica e elicitora de fitoalexinas em sorgo e soja por eucalipto (*Eucalyptus citriodora*). **Summa Phytopathologica**, v.33, n. 4, p.383-387, 2007.

BOURSCHEID, K. et al. Espécies prioritárias: Alimentícias: *Eugenia uniflora* – pitangueira. Cap. 5. p. 170-177. In CORADIN, L., SIMINSKI, A., REIS, A. **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro – Região Sul**. Brasília: MMA, 2011. 934p

BRADFORD, M.A. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

BRUN, G., MOSSI, A. J. Caracterização química e atividade antimicrobiana do óleo volátil de pitanga (*Eugenia uniflora* L.). **Perspectiva**, Erechim. v.34, n.127, p. 135-142, 2010.

CABRAL, R. N. **Progresso temporal da Septoriose em tomateiro orgânico em distintos sistemas e níveis de irrigação**. Brasília, 2012. 31p. Monografia de Graduação em Agronomia - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2012.

CAMARGO, F. P. et al. Cadeia produtiva de tomate industrial no Brasil: resenha da década de 1990, produção regional e perspectivas. **Informações Econômicas**, São Paulo, v.36, n.11, nov. 2006.

CAMPOS, A. C. et al. Atividade de peroxidase e polifenoloxidase na resistência do feijão à antracnose. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.39, n.7, p.637-643, jul. 2004.

CARLOS, M. M. et al. Efeito de extrato bruto e óleo essencial de *Achillea millefolium* em desenvolvimento *in vitro* de *Corynespora cassiicola* e proteção de pepino à mancha de corinespora. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.77, n.2, p.309-316, abr./jun., 2010.

CATÃO, H. C. R. M. et al. Caracterização Epidemiológica e Resistência de Genótipos de Tomateiro Cereja a *Alternaria solani*. **Horticultura Brasileira** v.29, n.2, p. 1405-1413, 2011.

CAVALCANTI, F.R. et al. Acibenzolar-S-metil e Ecolife® na indução de respostas de defesa do tomateiro contra a mancha bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria*). **Fitopatologia Brasileira**, v.31, n.4, p.372-380, 2006.

CAVALCANTI, F. R. et al. Atividades de quitinase e beta-1,3-glucanase após eliciação das defesas do tomateiro contra a mancha-bacteriana. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.41, n.12, p.1721-1730, dez. 2006.

DI PIERO, R.M.; PASCHOLATI, S.F. Indução de resistência em plantas de pepino contra *Colletotrichum lagenarium* pela aplicação de extratos de basidiocarpos de *Lentinula edodes* e de *Agaricus blazei*. **Summa Phytopathologica**, v.30, n.2, p.243-250, 2004.

DILL, A. M. **Extratos vegetais no controle da pinta preta (*Alternaria solani*) em tomateiro**. 2009. 52 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) Universidade Federal de Santa Maria, Curso de pós-graduação em Agronomia, Santa Maria, 2009.

DRUMOND, M. R. S. et al. **Estudo da atividade antibacteriana da *Eugenia uniflora* L. (Pitanga) *in vitro* sobre a microflora cariogênica e sua utilização na descontaminação de escovas dentárias**. [Relatório Final do PIBIC (CNPq)]. João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba; 2004.

DUANGMAL, K.; APENTEN, R.K.O. A comparative study of polyphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta*) e potato (*Solanum tuberosum* var. Romano). **Food Chemistry**, Barking, v. 64, n. 3, p. 351-359, 1999.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUARIA. Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças. **A cultura do tomateiro (para mesa)**. Brasília: EMBRAPA, 1993.

FAO-FAOSTAT. **Database Results-2010**. Disponível em:<  
<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>>.. Acesso em 10 nov. 2015.

FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium** (Lavras), v. 6, p. 36-41, 2008.

FERREIRA, S. M. R. **Características de qualidade do tomate de mesa (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivado nos sistemas convencional e orgânico comercializado na região metropolitana de Curitiba**. 2004. 249 f. Tese (Doutorado de Tecnologia em alimentos) – Universidade Federal do Paraná, Curso de pós-graduação em tecnologia de alimentos, Curitiba, 2004.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo Manual de Olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 3. ed: Viçosa: UFV, 2007, p. 412.

FIORI, A.C.G. et al. Antifungal activity of leaf extrats and essential oils of some medicinal plants against *Didymella bryoniae*. **Journal of Phytopathology**, v.148, n. 7-8, p.483-487, 2000.

FORMENTINI, Heloísa Maria. **Avaliação de indutores de resistência biótico e abiótico e extratos vegetais no controle de *Meloidogyne incógnita* em tomateiro**. 2012. 90 p. Tese (Doutorado em Produção vegetal). Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Curso de Pós-graduação em Agronomia, Marechal Cândido Rondon, 2012.

FRANZENER. G., et al. Atividades antibacteriana, antifúngica e indutora de fitoalexinas de hidrolatos de plantas medicinais. **Semina: Ciências agrárias**, Londrina, v. 28, p. 28-38, 2007.

GUIMARÃES, L. G. L., et al. Atividades antioxidante e fungitóxica do óleo essencial de capim-limão e do citral. **Revista Ciência Agrônômica**, Centro de Ciências Agrarias, Fortaleza, v. 42, n. 2, p. 464-472, 2011.

GUIMARÃES, Leysimar Ribeiro Pitzr. **Avaliação da indução de resistência no controle do vira cabeça do tomateiro**. Dissertação (Mestrado em Horticultura), Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Curso de Pós-graduação em Agronomia, Botucatu, 2013.

INÁCIO, M. M.; PASCUALI, L. C.; ZELA, S. P.; PAULA, P. R. Diagnóstico de óleos essenciais, sobre o desenvolvimento de *Phomopsis phaseoli* var. *sojae*, *Fusarium* sp. e *Macrophomina phaseolina*. In: **2º Jornada Científica da Unemat**, Barra do Bugres, 5 p., 2009.

KUROZAWA, C.; PAVAN, M.A. Doenças do tomateiro. In: KIMATI, H. et al. (Ed.). **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 2005. v.2, p.607-626.

LEVER, M. A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. **Analytical Biochemistry**, v.47, n.1, p.273-279, 1972.

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

LIRA JÚNIOR, J. S., BEZERRA, J. E. F., LEDERMAN, I.E., SILVA JUNIOR, J. F. **Pitangueira**. Recife: Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária-IPA, 2007. 87p.



LOBATO, A. K. S. et al. Ação do Óleo Essencial de *Piper aduncum* L. utilizado como fungicida natural no tratamento de sementes de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 915-917, jul. 2007.

LUCAS, G. C. **Óleos essenciais no controle da pinta preta do tomateiro**. 2012. 92 f. Tese (Doutorado em Agronomia – Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Curso de Pós-graduação em Agronomia/Fitopatologia, Lavras, 2012.

LUSSO, M.F.G.; PASCHOLATI, S.F. Activity and isoenzymatic pattern of soluble peroxidases in maize tissues after mechanical injury or fungal inoculation. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.25, p.244-249, 1999.

MORAES, W. B. et al. Aplicação foliar de fungicidas e produtos alternativos reduz a severidade do oídio do tomateiro. **Nucleus**, Alegre, v.8, n.2, p. 57-68, out. 2011.

MORAIS, L. A. S. Óleos essenciais no controle fitossanitário. In: BETTIOL, W., MORANDI, M. (Ed.). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 2009. p.341.

NAIKA, S. et al. A cultura do tomate: produção, processamento e comercialização. **Fundação Agromisa e CTA**, 2006.

OGBEBOR, N.; ADEKUNLE, A.T. Inhibition of conidial germination and mycelial growth of *Corynespora cassiicola* (Berk and Curt) of rubber (*Hevea brasiliensis* muell. Arg) using extracts of some plants. **African Journal of Biotechnology**, v.4, p.996-1000, 2005.

OLIVEIRA, C. B. et al. Avaliação da eficácia da descontaminação de escovas dentárias pelo uso do spray de óleo essencial da *Eugenia uniflora* L. (Pitanga). João Pessoa. **Cienc Odontol Bras**. v.12, n.2, p. 29-34, 2009.

OOTANI, Marcio Akio. **Atividade inseticida, antifúngica e herbicida dos óleos essenciais de *Eucalyptus citriodora* e *Cymbopogon nardus***. 2010. 121 f. Dissertação (Mestrado Em Produção Vegetal). Universidade Federal do Tocantins, Gurupi, 2010.

PAULA J.T. et al. Pós-colheita da cultura do tomate (*Solanum lycopersicum*) orgânico: Avaliação do amadurecimento e qualidade. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 51., 2011, Viçosa. **Anais...** Viçosa: ABH, 2011.

PEDROSA, M. W. et al. Desempenho de cultivares de tomate orgânico em sistema orgânico de produção. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 51. 2011, Viçosa. **Anais eletrônicos...** Viçosa: ABH, 2011. Disponível em: <[http://www.cnph.embrapa.br/organica/pdf/resumo/desempenho\\_cultivares\\_tomate.pdf](http://www.cnph.embrapa.br/organica/pdf/resumo/desempenho_cultivares_tomate.pdf)>. Acesso em 5 nov. 2015.

PEITER-BENINCA, C. et al. Indução de fitoalexinas e atividade de peroxidases em sorgo e soja tratados com extratos de basidiocarpos de *Pycnoporus sanguineus*. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.75, n.3, p.285-292, 2008.

PEREIRA, R. B. et al. Ativação de defesa em cacaueteiro contra a murcha-de-verticílio por extratos naturais e acibenzolar-S-metil. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.43, n.2, p.171-178, fev. 2008.

PESSINI, G. L. et al. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica de extratos de plantas utilizados na medicina popular. **Revista Brasileira Farmacognosia**. v.13, n.1, p. 21-24, 2003.

PIPER, Piper et al. Weak acid adaptation: the stress response that confers resistance to organic acid food preservatives. **Microbiology**. Washington, v.147, n.10, p. 2635–2642, 2001.

PULZ, Pablo. **Crescimento e esporulação de *Alternaria dauci* e *A. solani* em meio de cultura**. 2007. 69 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) Universidade de São Paulo – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Curso de pós-graduação em Agronomia, Piracicaba, 2007.

RAMOS, A. R. P. et al. Acúmulo de carboidratos no desenvolvimento de tomateiro tratado com produtos químicos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 36, n. 2, p. 705-718, 2015.

RODRIGUES, E. et al. Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de alface em sistema de cultivo orgânico contra *Sclerotinia sclerotiorum* pelo extrato de gengibre. **Summa Phytopathologica**, v.33, n.2, p.124-128, 2007.

ROTH, U., FRIEBE, A., SCHNABL, H. Resistance induction in plants by a brassinosteroid-containing extract of *Lychnis viscaria* L. **Journal of Biosciences**, v.55, n.7, p.365-367, 2000.

SANTOS NETO, J., et al. Subprodutos de capim-limão no controle de septoriose do tomateiro em sistema de produção orgânica. **Rev. Bras. de Agroecologia**. v.11, n.1, p.35-44, 2016.

SALGADO, A. P. S, et al. Avaliação da Atividade Fungitóxica de Óleos Essenciais de Folhas de *Eucalyptus* sobre *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* e *Bipolaris sorokiniana*. **Ciênc. agrotec.**, Lavras. v.27, n.2, p.249-254, 2003

SARMIENTO RAMÍREZ-OTÁROLA, J.R.; MORETTO, K. K.C; CHURATA-MASCA, M.G.C. Controle da pinta-preta em tomateiro e da mancha-zonada em pepino por meio de bicarbonato de sódio e óleo vegetal. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 17, n. 2, p.159-163, julho, 1999.

SHIRAHIGE, Fernando H.et al. Produtividade e qualidade de tomates Santa Cruz e Italiano em função do raleio de frutos. **Horticultura Brasileira**, São Paulo, v. 28, n. 3, p. 292-298, ago. 2010.

SILVA, R.F.; PASCHOLATI, S.F.; BEDENDO, I.P. Indução de resistência em tomateiro por extratos aquosos de *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra *Ralstonia solanacearum*. **Fitopatologia Brasileira**, v.32, p.189-196, 2007.

SILVA, Juliana Almeida Barros. **Regulação da biossíntese da vitamina E em tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.): da diversidade natural à manipulação do metabolismo**. 2015. 247 p. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociência, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2015.

SOBRAL, M.; PROENÇA, C.; SOUZA, M.; MAZINE, F.; LUCAS, E. *Myrtaceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB10560>>. Acesso em 02 Dez. 2015

SOUZA J. R. et al. Potencialidade de fungicidas biológicos no controle de requeima do tomateiro. **Horticultura Brasileira**, v. 32, n.1, p. 115-119, 2014.

STANGARLIN, J. R., et al. Plantas medicinais e o controle alternativo de fitopatógenos. Biotecnologia, **Ciência & Desenvolvimento**, v.11, p.16-21, 1999.

TÖFOLI, J.G., DOMINGUES, R.J., FERRARI, J.T. *Alternaria* spp. em oleráceas: sintomas, etiologia, manejo e fungicidas. **Instituto Biológico**, São Paulo, v.77, n.1, p.21-34, 2015.

TOLEDO, Márcia Vargas. **Fungitoxidade contra *Alternaria solani*, controle da pinta preta e efeito sobre o crescimento do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill) por medicamentos homeopáticos**. 2009. 95 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Curso de pós-graduação em Agronomia, Marechal Cândido Rondon, 2009.

TOLEDO, M. V.; STANGARLIN, J.R.; BONATO, C.M. Controle da Pinta Preta e Efeito Sobre Variáveis de Crescimento em Tomateiro por Preparados Homeopáticos. *Summa Phytopathologica*, v.41, n.2, p.126-132, 2015.

TOLEDO, M. V., STANGARLIN, J. R., BONATO, C. M. Controle da Pinta Preta em Tomateiro com Preparados Homeopáticos de Própolis. In: VI CONGRESSO BRASILEIRO DE AGROECOLOGIA; II CONGRESSO LATINO AMERICANO DE AGROECOLOGIA, 2009, Curitiba. **Anais eletrônicos...** Curitiba: EMATER, UNIOESTE, UEM: 2009. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/sp/v41n2/0100-5405-sp-41-02-00126.pdf>>. Acesso em 5 nov. 2015.

TOMAZONI, E. Z.; GIANI, S. G.; RIBEIRO, R. T.S.; PAULETTI, G. F., SCHWAMBACH, J. Atividade antifúngica do óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum* Ness sobre fungos fitopatogênicos do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.). In: VIII CONGRESSO BRASILEIRO DE AGROECOLOGIA, 2013, Porto Alegre. **Anais eletrônicos**. Porto Alegre: Universidade de Caxias do Sul: 2013. Disponível em: < [www.abagroecologia.org.br/revistas/index.php/cad/article/download/13846/9464](http://www.abagroecologia.org.br/revistas/index.php/cad/article/download/13846/9464)>. Acesso em 18 nov. 2016.

UMESHA, S. Phenylalanine ammonia lyase activity in tomato seedlings and its relationship to bacterial canker disease resistance. **Phytoparasitica**, v.34, n.1, p.68-71, 2006.

VALE, F. X. R. et al. Doenças causadas por fungos em tomate. In: ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R.; COSTA, H. (Eds) **Controle de doenças de plantas – hortaliça**. Viçosa: UFV, p. 699-755, 2000.