



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL**

**CAMPUS - LARANJEIRAS DO SUL**

**CURSO DE AGRONOMIA**

**TELMAR MORAES WELTER**

**EMULSÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE ALECRIM-DO-CAMPO (*Baccharis dracunculifolia*) NO CONTROLE DE DOENÇAS E INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM TOMATEIRO**

**LARANJEIRAS DO SUL**

**2022**

**TELMAR MORAES WELTER**

**EMULSÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE ALECRIM-DO-CAMPO (*Baccharis dracunculifolia*) NO CONTROLE DE DOENÇAS E INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM TOMATEIRO**

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

Orientador: Prof. Dr. Gilmar Franzener

**LARANJEIRAS DO SUL**

**2022**

**Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS**

Welter, Telmar Moraes  
EMULSÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE ALECRIM-DO-CAMPO  
(Baccharis dracunculifolia) NO CONTROLE DE DOENÇAS E  
INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM TOMATEIRO / Telmar Moraes  
Welter. -- 2022.  
29 f.:il.

Orientador: Prof. Dr. Gilmar Franzener

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -  
Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de  
Bacharelado em Agronomia, Laranjeiras do Sul, PR, 2022.

1. Compostos voláteis de plantas. 2. Xanthomonas  
vesicatoria. 3. Septoria lycopersici. I. Franzener,  
Gilmar, orient. II. Universidade Federal da Fronteira  
Sul. III. Título.

TELMAR MORAES WELTER

**EMULSÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE ALECRIM-DO-CAMPO (*Baccharis dracunculifolia*) NO CONTROLE DE DOENÇAS E INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM TOMATEIRO**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado como requisito para obtenção de grau de Bacharel em Agronomia linha de formação em Agroecologia pela 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: 05/04/2022.

BANCA EXAMINADORA

  
Prof. Dr. Gilmar Franzener

  
Prof. Dr. Henrique von Hertwig Bittencourt

  
Dr. Augusto Cesar Prado Pomari Fernandes

Dedico este trabalho aos meus familiares, que não pouparam esforços para que eu pudesse concluir meus estudos.

## RESUMO

Óleos essenciais (OE) correspondem a diversos compostos voláteis de plantas que podem influenciar atividades biológicas de diversos organismos. O Alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia* D. C.) é conhecido pelo uso terapêutico da própolis-verde, no entanto pouco se sabe do potencial do OE dessa espécie no controle de doenças de plantas. Este trabalho teve por objetivo avaliar o potencial da emulsão do OE de *Baccharis dracunculifolia* (Bd) no controle *in vitro* e *in vivo* de *Septoria lycopersici* (Sl) e *Xanthomonas vesicatoria* (Xv) causadoras de doenças em tomateiro (*Solanum lycopersicum*). Ensaio *in vitro* foram preparados a partir da emulsão inicial (100%) na concentração de 300 µl/mL. Foram testadas 10 concentrações (0; 0,1; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 4,0; 5,0%) com 4 repetições cada. Para Sl avaliou-se a germinação de esporos (Ge) e o crescimento micelial (Cm). Para Xv avaliou-se a concentração da suspensão bacteriana (Csb) em meio de cultura líquido. Três ensaios *in vivo* foram realizados em plantas de tomateiro (cv. Santa Clara I-5300) para avaliação de severidade de septoriose, severidade de mancha-bacteriana e avaliação bioquímica de indução de enzimas de defesa vegetal peroxidases (Pro), polifenoloxidasas (Plo) e teor de Proteínas solúveis totais (Pst) sendo 5 tratamentos (0; 1,0; 4,0; 7,0; 10,0%) com 5 repetições cada e 2 plantas por repetição. Os resultados foram expressos em mg proteína.g tecido<sup>-1</sup> para Pst e Δ abs. min<sup>-1</sup>mg proteína<sup>-1</sup> para Pro e Plo. Para condições *in vitro* foi observado redução no percentual germinativo e crescimento micelial de Sl e inibição total de Xv a partir de 1,5%. Houve significativo aumento de Pst até 4%, e aumento na atividade das enzimas Pro e Plo até a concentração máxima (10%) sem danos de fitotoxidez às plantas em doses superiores às necessárias para controlar o desenvolvimento dos patógenos *in vitro*. Não houve diferença estatística nas avaliações de severidade de septoriose e mancha-bacteriana. Deste modo, pode-se considerar que a utilização da emulsão do óleo essencial de Bd para o controle de Sl e Xv e o aumento da atividade enzimática na produção de moléculas que atuam na proteção da planta como barreiras químicas e físicas (quinonas, taninos e lignificação) apresentou resultados satisfatórios.

Palavras chave: *Septoria lycopersici*; *Xanthomonas vesicatoria*; Enzimas de defesa vegetal.

## ABSTRACT

Essential oils (EO) correspond to several volatile plant compounds that can influence the biological activities of different organisms. Alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia* D. C.) is known for the therapeutic use of green-propolis, however little is known about the potential of the EO of this species in the control of plant diseases. This work aimed to evaluate the potential of *Baccharis dracunculifolia* (Bd) EO emulsion in the in vitro and in vivo control of *Septoria lycopersici* (Sl) and *Xanthomonas vesicatoria* (Xv) that cause diseases in tomato (*Solanum lycopersicum*). In vitro assays were prepared from the initial emulsion (100%) at a concentration of 300 µl/mL. Ten concentrations were tested (0; 0.1; 0.5; 1.0; 1.5; 2.0; 2.5; 3.0; 4.0; 5.0%) with 4 replications each. For Sl, spore germination (Ge) and mycelial growth (Cm) were evaluated. For Xv, the concentration of bacterial suspension (Csb) in liquid culture medium was evaluated. Three in vivo assays were performed on tomato plants (cv. Santa Clara I-5300) to assess septoria severity, bacterial spot severity and biochemical assessment of the induction of plant defense enzymes peroxidases (Pro), polyphenoloxidases (Plo) and total soluble Protein (Pst) content, being 5 treatments (0; 1.0; 4.0; 7.0; 10.0%) with 5 replicates each and 2 plants per replicate. Results were expressed in mg protein.g tissue<sup>-1</sup> for Pst and Δ abs. min<sup>-1</sup>mg protein<sup>-1</sup> for Pro and Plo. For in vitro conditions, a reduction in the germination percentage and mycelial growth of Sl and total inhibition of Xv from 1.5% was observed. There was a significant increase in Pst up to 4%, and an increase in the activity of Pro and Plo enzymes up to the maximum concentration (10%) without phytotoxicity damage to plants at doses higher than those necessary to control the development of pathogens in vitro. There was no statistical difference in the evaluations of septoria and bacterial spot severity. Thus, it can be considered that the use of Bd essential oil emulsion for the control of Sl and Xv and the increase of enzymatic activity in the production of molecules that act in the protection of the plant as chemical and physical barriers (quinones, tannins and lignification) showed satisfactory results.

Keywords: *Septoria lycopersici*; *Xanthomonas vesicatoria*; Plant defense enzymes.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	9
2. REFERENCIAL TEÓRICO .....	11
2.1 CULTURA DO TOMATEIRO .....	11
2.2 DOENÇAS DO TOMATEIRO .....	11
2.3 ÓLEOS ESSENCIAIS NO CONTROLE DE DOENÇAS EM PLANTAS .....	12
2.4 <i>BACCHARIS DRACUNCULIFOLIA</i> .....	12
2.5 INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM PLANTAS .....	14
3. METODOLOGIA .....	15
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	17
5. CONCLUSÃO .....	25
6. REFERÊNCIAS.....	26



## 1. INTRODUÇÃO

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.), é uma das hortaliças mais produzidas no país, tendo grande importância econômica em várias regiões. Segundo dados do IBGE (2020), a safra nacional foi de 3,75 milhões de toneladas, onde a região com maior produção foi a Sudeste com 1,6 milhões de toneladas, seguida pelas regiões Centro-oeste e Sul com 1,13 milhões e 482 mil toneladas respectivamente as maiores produtoras.

O tomate produzido é destinado tanto para o consumo *in natura* quanto para o processamento industrial, havendo cultivares desenvolvidas para cada fim (SANTOS et al., 2017). Independentemente da variedade cultivada, é necessário que durante o ciclo da cultura sejam realizados manejos fitossanitários para o controle de pragas e doenças (SILVA et al., 2006).

Este manejo na maioria das lavouras é realizado de forma convencional com o emprego massivo de produtos químicos de origem sintética que causam sérios danos ao meio ambiente e possuem potencial tóxico contra a saúde humana. Devido a isso, muitas pesquisas vêm buscando alternativas à utilização destes produtos com vistas a moléculas de origem natural e biodegradável (ISMAN, 2006) como os óleos essenciais (OE).

Os OE são substâncias aromáticas voláteis extraídos de plantas ou partes delas, que apresentam natureza lipofílica e diferentes composições química que variam conforme a parte da planta, espécie, estágio fenológico, distribuição geográfica, tipo de solo e clima onde o material foi coletado, etc., (STEFFENS, 2010). Por se tratar de produto de origem biológica, os OE apresentam composição variada de moléculas orgânicas, sendo definidas como misturas complexas de terpenos, sesquiterpenos, diterpenos e eventualmente fenilpropanóides e moléculas menores como álcoois, aldeídos e cetonas de cadeias curtas (SERAFINI et al., 2001; SIANI, 2000).

Os óleos essenciais produzidos pelas plantas podem atuar em diferentes mecanismos e rotas metabólicas e estão associados a funções relacionadas à sobrevivência e perpetuação da espécie, com fundamental papel na defesa contra predadores e microrganismos, assim como na atração de agentes polinizadores ou dispersores de propágulos vegetativos (HUET, 1991). Por apresentar composição variada de diferentes moléculas, diversos estudos com OE vem sendo realizados para avaliar seu potencial no controle de microrganismos causadores de doenças em plantas, pois podem atuar de diversas formas sem que ocorra a seleção de resistência nos patógenos (DE MORAIS, 2009).

Outra forma de atuação dos óleos essenciais é sua utilização como agentes indutores de resistência em plantas. Alguns mecanismos de resistência podem ser ativados com a entrada de patógenos ou com a indução através de elicitores, que são moléculas introduzidas nas plantas. Alguns mecanismos mais conhecidos são a formação de barreiras estruturais como o enrijecimento da parede celular por lignificação, formação de barreiras em ferimentos e como barreiras químicas antimicrobianas (CAMPOS, 2009). Exemplos destes mecanismos de defesa induzida são as enzimas peroxidases e polifenoloxidasas que atuam na produção de compostos estruturais e antimicrobianos, respectivamente (CAMPOS; SILVEIRA, 2003).

Atualmente tem-se grande avanço em pesquisas com OE, porém com carência em métodos práticos de utilização destes produtos devido à alta capacidade de volatilização (SILVA, 2019). No Brasil, as espécies de maior importância na produção e comercialização de óleo essencial são laranja (*Citrus sinensis* L.) e Lima destilada (*Citrus aurantifolia*), as quais estão entre as 18 espécies mais utilizadas no mundo (BIZZO, 2009). No entanto existem diversas espécies com aptidão a extração de OE, porém pouco conhecidas para essa finalidade, como plantas cultivadas e espontâneas.

O Alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*) é uma planta espontânea pertencente à família Asteraceae. A espécie apresenta hábito subarborescente, perene, tronco lenhoso de coloração acinzentado, folhas pequenas serrilhadas, flores brancas com grande formação de aquênios do tipo paraquedas que auxiliam na dispersão pelo vento (Anemocoria), o que a caracteriza como uma planta invasora e colonizadora, principalmente em áreas de pastagens degradadas (MOREIRA; BRAGANÇA, 2011).

Conhecida também pelos nomes comuns de Vassourinha ou Alecrim-silvestre, a planta produz uma resina que abelhas da espécie *Apis mellifera* L. coletam para suas colmeias, a qual é conhecida e comercializada como própolis-verde, que possui amplo uso medicinal e fitoterápico com ações analgésica, anti-inflamatória, antinociceptiva, antioxidante, antidispéptica, descongestionante de vias respiratórias, hipoglicemiante, imunoestimulante, sendo utilizado pela indústria farmacêutica e alimentícia na produção de alimentos funcionais (DUARTE, 2003).

O óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* possui uma grande variedade de substâncias, principalmente do grupo dos terpenos como sesquiterpenos, com maior concentração de germacreno e cariofileno, sendo encontrados também  $\beta$ -pineno, ledol, espatulenol e limoneno (PAROUL et al., 2016; PEDROTTI; RIBEIRO; SCHWAMBACK, 2019). Estas substâncias podem exercer atividade antimicrobiana, porém não há muitos estudos que evidenciem sua utilização no controle de *Septoria lycopersici* e *Xanthomonas vesicatoria*

na cultura do tomateiro.

O presente trabalho buscou avaliar o potencial da emulsão de óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* no controle *in vitro* de *Septoria lycopersici* e *Xanthomonas vesicatoria* e o potencial indutor de mecanismos de proteção em tomateiros.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 CULTURA DO TOMATEIRO

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) pertence a família Solanaceae, tem como centro de origem a América do Sul, mais precisamente na fronteira entre o Chile e o Equador. Todavia a planta foi domesticada no México e introduzida na Europa pelos espanhóis, no início do século XVI (HARVEY et al., 2002; ANDRADE et al., 2009). Atualmente é a segunda hortaliça em importância econômica e social no Brasil e no mundo, sendo cultivado e produzido na forma in natura e industrializada (SANTOS et al., 2017).

A produção brasileira do tomate no ano de 2020 foi de 3,753 milhões de toneladas em uma área de cerca de 52,717ha. Entre os maiores produtores destacam-se os estados de Goiás, São Paulo e Minas Gerais (IBGE (2020). Com aumento do cultivo da cultura surgem também vários problemas fitossanitários (ARAÚJO et al., 2002). As doenças na cultura do tomateiro podem ser de origem bacteriana, fúngica ou viral, podendo ocasionar perdas significativas na produção (LUCAS, 2012).

Para evitar esse problema, os produtores adotam medidas de controle que, na maioria das vezes, resumem-se ao uso de produtos químicos, o que, por sua vez, pode ocorrer de maneira abusiva e indiscriminada, gerando prejuízos ambientais e seleção de patógenos resistentes a esses produtos (FRANZENER et al., 2007). Dentre as doenças do tomateiro algumas são de ocorrência muito comum e de difícil controle, como a septoriose (*Septoria lycopersici*) e a mancha bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria*) (INOUE-NAGATA et al., 2016).

### 2.2 DOENÇAS DO TOMATEIRO

A cultura do tomateiro (*Solanum lycopersicum*) pode ser acometida por diversas doenças durante seu ciclo de vida, que pode ocorrer por fatores bióticos (transmissíveis) ou abióticos (não transmissíveis). Dentre as doenças fúngicas transmissíveis destacam-se tombamento de mudas (*Pythium* spp., *Rhizoctonia solani* e *Phytophthora* spp.), pinta preta, cancro da haste ou podridão escura (*Alternaria solani*), requeima ou mela (*Phytophthora infestans*), septoriose (*Septoria lycopersici*), oídio (*Oidium neolycopersici*), murcha-de-

esclerócio (*Sclerotium rolfsii*), podridão-de-esclerotínia (*Sclerotinia sclerotiorum*), murcha de fusarium (*Fusarium oxysporum*). Dentre as doenças bacterianas destacam-se murcha-bacteriana (*Ralstonia solanacearum*), mancha-bacteriana (*Xanthomonas* spp.), pinta-bacteriana (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*), podridão-mole (*Erwinia* spp.). Doenças viróticas como topo-amarelo (*Tomato yellow top virus* - ToYV ou *Potato leafroll virus* - PLRV), mosaico-do-fumo (*Tomato mosaic virus* - ToMV ou *Tabaco mosaic virus* - TMV), vira-cabeça-do-tomateiro (Tospovirus spp. - TSWV, TCSV, GRSV e CSNV), e nematóide-de-galhas (*Meloidogyne* spp.) entre outros (LOPES; DE ÁVILA, 2005).

As doenças podem ocorrer na cultura do tomateiro tendem ser mais ou menos intensas em função de fatores ou condições como clima, tipo de solo, população de microrganismos ou patógenos presentes no local de plantio, sistema de implantação e condução da lavoura, localização da área plantada, tipo de irrigação, cultivar plantada e estado nutricional da planta. Medidas de evitar a entrada, estabelecimento e disseminação de patógenos devem ser realizadas durante todo o manejo da cultura como o tratamento de sementes, eliminação de restos culturais, rotação de culturas de no mínimo três anos, manejo fitossanitário de doenças e patógenos transmissores (LOPES; DE ÁVILA, 2005).

### 2.3 ÓLEOS ESSENCIAIS NO CONTROLE DE DOENÇAS EM PLANTAS

Considerando a necessidade de reduzir o uso de produtos sintéticos, produtos naturais vêm sendo estudados e utilizados no controle de doenças em plantas. Dentre estes estão os óleos essenciais que são produtos do metabolismo secundário das plantas, sendo compostos por misturas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas, com propriedades biológicas, obtidos de partes das plantas através de destilação por arraste a vapor de água, destilação ou por solventes (MORAIS et al., 2009). Uma das limitações de uso de óleos essenciais tem sido a falta de informações de efeitos e potenciais formas de uso, baixa solubilidade em água e alta volatilidade. Assim, o uso de tensoativos ou uso de polímeros para encapsulação podem representar medidas promissoras (SILVA, 2019).

### 2.4 *BACCHARIS DRACUNCULIFOLIA*

O Alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*) também conhecida como vassourinha, pertencente à família Asteraceae, é uma planta espontânea subarborescente de ocorrência em campos abertos e pastagens em diversos países da América do Sul. Sua floração atrai diversos insetos polinizadores, principalmente abelhas da espécie *Apis mellifera*, que além

do pólen coletam resina liberada pela planta, a qual é comercialmente vendida como própolis-verde é empregado nas indústrias de alimentos funcionais e farmacêutica para uso terapêutico (DUARTE, 2003).

Diversos estudos relatam a eficiência de extratos de *B. dracunculifolia* no controle de patógenos causadores de doenças humanas, animais e de plantas. A planta apresenta potencial no controle de patógenos causadores de doenças em humanos têm sido relatadas (SILVA FILHO et al., 2009). Soares et al. (2013) avaliou a Concentração Inibitória Mínima (CIM) necessária para causar sensibilidade de bactérias Gram positivas e Gram negativas ao extrato etanólico (15; 10; 5% v/v) de *B. dracunculifolia*, e verificou a sensibilidade *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *pseudomonas aeruginosas* à CIM de 15% e *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus pyogenes* à todas as concentrações testadas.

A espécie tem sido mais estudada por ser considerada a principal fonte de própolis verde, uma resina extraída por abelhas (INOKUCHI et al., 2006). A própolis verde tem apresentado importante atividade biológica, inclusive com potencial para novos medicamentos (SFORCIN; BANKOVA, 2011). Heimbach (2016) verificou maior efeito antimicrobiano do extrato hidroalcoólico de própolis-verde de Alecrim-do-campo sobre as bactérias Gram positivas *Staphylococcus aureus* e *S. intermedius*, e sobre bactérias Gram negativas observou maior susceptibilidade para *Escherichia coli* e em menor grau para *Salmonella typhimurium* e *Klebsiella pneumoniae*.

O óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* também vem sendo estudado nos últimos anos e de acordo com Luchesi et al., (2020) os principais compostos presentes no óleo essencial são e trans-nerolidol a (17,5%),  $\gamma$ -elemeno a (15,0%), D-limoneno (10,5%) e outros compostos em menor concentração. Também de acordo com Paroul et al., (2016) estes compostos possuem elevada capacidade antioxidante, aos óleos essenciais e extratos aquosos obtidos de *Baccharis dracunculifolia*.

O óleo essencial da planta *Baccharis dracunculifolia* tem demonstrado atividade antimicrobiana significativa sobre algumas bactérias como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, que são causadoras de doenças em animais e humanos (FERRONATTO et al., 2007). Gelinski et al. (2007) verificou ação inibitória do óleo essencial de Alecrim-do-campo sobre cepas de *Proteus* sp., *Staphylococcus* sp., *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*.

Ao avaliar a ação inibitória dos óleos essenciais de *B. dracunculifolia*, *Schinus terebinthifolius* (aroeirinha) e *Porophyllum ruderale* (arnica-brasileira) sobre o crescimento in-vitro de fungos fitopatogênicos (*Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*; *F. solani* f. sp. *phaseoli*;

*Sclerotinia sclerotiorum*; *S. minor*; *Rhizoctonia solani*; *Sclerotium rolfsii*; *Macrophomina phaseolina*), Fonseca et al. (2015) verificou maior eficiência do OE de Alecrim-do-campo em todas as concentrações testadas (0, 250, 500, 1000 e 3000 mg L<sup>-1</sup>) em comparação aos demais óleos, com destaque de redução para *Rhizoctonia solani* (80% a 250 mg L<sup>-1</sup>), *Sclerotium rolfsii* (98% a 500 mg L<sup>-1</sup>) e *F. solani* f. sp. *phaseoli* (41% a 1000 mg L<sup>-1</sup>).

## 2.5 INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM PLANTAS

Uma das respostas de defesa das plantas a fitopatógenos é a ativação de mecanismos latentes através da indução de resistência (KUHN, 2007). Esta é uma estratégia promissora para melhorar a capacidade de defesa de uma planta após o tratamento com agentes induzidos podendo ser moléculas de origem biótica ou abióticas, podendo conferir à planta resistência sistêmica por determinado período a um amplo espectro de agentes patogênicos. Essas moléculas são denominadas elicitores ou eliciadores, responsáveis por atuar na ativação ou indução dos mecanismos de defesa nas plantas (SMITH, 1996).

Entre os mecanismos de defesa se destacam os bioquímicos, como as enzimas peroxidases e polifenoloxidasas (CAVALCANTI et al., 2006). Cabe salientar que, esses elicitores podem desencadear nas plantas resistência local adquirida (RLA), resistência sistêmica induzida (RSI) e a resistência sistêmica adquirida (RSA). Apesar de respostas fenológicas das diferentes formas de resistência serem em parte semelhantes, estas diferem principalmente em relação ao local de ação no vegetal onde atua a resistência e a rota metabólica dos compostos chave envolvidos no processo de resistência (TERRY; JOYCE, 2004).

As isoenzimas peroxidases estão localizadas principalmente na parede celular vegetal, utilizando o poder oxidante de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou peróxidos orgânicos para diversas reações, ligações de polissacarídeos, ligações de monômeros, oxidação do ácido indol-3-acético, oxidação de fenóis, lignificação, regulação da elongação de células, cicatrização de ferimentos, defesa de patógenos e outras. A modificação estrutural na parede celular com o aumento da rigidez diminui o crescimento celular e em contrapartida aumenta a resistência química e mecânica em condições de estresse (CAMPOS; SILVEIRA, 2003).

As polifenoloxidasas estão presentes em maior quantidade em tecidos com ferimentos como os causados pela infecção por patógenos, atuando na hidroxilação de monofenóis em o-difenóis e na oxidação destes em quinonas que tem ação antimicrobiana. Outra forma de atuação das polifenoloxidasas é na oxidação dos monofenóis em polímeros que podem atuar como taninos ao formar complexos com proteínas que atuam como barreira física na entrada de patógenos (CAMPOS; SILVEIRA, 2003).

### 3. METODOLOGIA

O presente trabalho foi realizado no laboratório de Fitopatologia e casa de vegetação da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), *Campus Laranjeiras do Sul* – PR. O OE foi extraído por arraste a vapor de folhas frescas de *Baccharis dracunculifolia* coletadas na área da Universidade em 01/06/2021. Para a utilização do OE foi realizada a emulsão de 6 mL do óleo essencial com 20 mL de água destilada e 1 mL de Tween 80, resultando na emulsão inicial de concentração 300 µl/mL de OE, a qual foi considerada 100%. A mistura foi homogeneizada em agitador magnético a 500 rpm por 10 min.

Em condições *in vitro* foi realizado ensaio para avaliar a emulsão do OE de *B. dracunculifolia* sobre os patógenos *Septoria lycopersici* e *Xanthomonas vesicatoria*. Realizou-se a diluição da emulsão do OE em diferentes concentrações que constituíram tratamentos (0; 0,1; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 4,0; 5,0%). Para avaliar a germinação de esporos de *Septoria lycopersici* utilizou-se 40 µL de suspensão de esporos calibrada em  $1 \times 10^5$  conídios mL<sup>-1</sup> acrescidos de 40 µL da solução de cada tratamento foram colocados em placa para teste de ELISA, que foi acondicionada em incubadora de Demanda Bioquímica de Oxigênio (BOD) a 25 °C, no escuro por 16 horas. Após esse período a germinação foi interrompida, aplicando-se 10 µL de azul algodão de lactofenol. A determinação da porcentagem de germinação foi realizada por meio da contagem em microscópio óptico de 100 esporos por repetição que era constituída por um “pocinho” da placa de elisa, sendo cada tratamento formado de 4 repetições. Foram considerados como germinados os esporos que possuíam hifas visíveis.

Para o crescimento micelial de *S. lycopersici* foi realizada a diluição do OE emulsionado nas mesmas concentrações anteriormente citadas, misturado ao meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA) antes de verter em placa de Petri. Os tratamentos receberam um disco de micélio do patógeno e acondicionados em incubadora de Demanda Bioquímica de Oxigênio (BOD) a 26°C. A medição do crescimento micelial na horizontal e vertical foi realizada ao 5, 7 e 9º dias para obtenção das médias representativas.

A atividade antibacteriana *in vitro* foi avaliada sobre a fitobactéria *Xanthomonas vesicatoria*, causadora da mancha bacteriana. Avaliou-se a Concentração da suspensão bacteriana (Csb) em meio de cultura líquido Agar broth, em tubos estéreis de capacidade 10 mL, os quais receberam os tratamentos e uma alíquota de 100 µL de suspensão bacteriana com  $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>, mantidos sob agitação constante em Incubadora Shaker de Agitação Orbital e Aquecimento a 27°C/48h. Em seguida, foi determinada a absorbância a 580 nm em espectrofotômetro. Cada tratamento contou com uma repetição extra sem a adição da alíquota

bacteriana, a qual foi utilizada como base para a realização da calibragem do espectrofotômetro para a leitura das repetições do tratamento.

Em condições *in vivo*, foram realizados três bioensaios com plantas de tomateiro em casa de vegetação para avaliação do efeito dos tratamentos. Um bioensaio sobre severidade de septoriose, outro bioensaio para avaliação da mancha-bacteriana e outro bioensaio para avaliação bioquímica de possível indução de enzimas relacionadas à defesa vegetal. As plantas de tomateiro cv. Santa Clara I-5300, foram produzidas em bandejas de polietileno contendo substrato vegetal para mudas, e aos 28 dias foram transplantadas para vasos de 2 L contendo 200 g de composto orgânico e terra corrigida conforme recomendação para a cultura de tomate (SOUZA; RESENDE, 2003). As plantas foram mantidas em casa de vegetação climatizada, com temperatura média de 26 °C, sob irrigação do tipo aspersão conforme a necessidade da cultura. Foi realizado teste de fitotoxidez em um grupo de plantas a fim de encontrar a melhor dose de emulsão do OE que não causasse danos às plantas, a qual foi utilizada como sendo a dose mais forte a ser testada nos seguintes tratamentos do experimento. Realizou-se a diluição da emulsão do OE em diferentes concentrações que constituíram tratamentos (0; 1,0; 4,0; 7,0; 10,0%). A aplicação dos tratamentos foi realizada por pulverização de toda parte aérea das plantas até aos 30 dias após o transplante.

No bioensaio de severidade septoriose, a suspensão de esporos ( $1 \times 10^4$  conídios mL<sup>-1</sup>) foi pulverizada sobre as plantas até ponto de escorrimento, 72 horas após a aplicação dos tratamentos. Em seguida, as plantas foram mantidas em câmara úmida por 20 horas. No bioensaio da mancha bacteriana, a suspensão de bactérias ( $1 \times 10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>) foi inoculada por pulverização sobre as plantas até ponto de escorrimento, 72 horas após a aplicação dos tratamentos. As plantas foram mantidas em câmara úmida por 6 h antes e 20 horas após a inoculação. A avaliação da severidade das doenças foi realizada com o aparecimento dos sintomas com auxílio de escala diagramática (SILVA et al., 2018). No bioensaio para análise de análises bioquímicas, foi realizada a coleta de amostras 72 horas após a aplicação dos tratamentos. As amostras coletadas (cinco discos de 1,5 cm de diâmetro) foram imediatamente congeladas a -20 °C para posterior análise bioquímica. Foi avaliada a atividade enzimática de peroxidase, polifenoloxidase e proteínas totais. O extrato enzimático foi obtido adicionando 2 mL de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0) contendo 1% (p/p) de PVP (polivinil-pirrolidona) nas amostras com auxílio de almofariz de porcelana. O homogeneizado foi centrifugado a 14.500 g durante 20 min a 4 °C.

O conteúdo de proteínas totais foi determinado pelo método de Bradford (1976). Para isso, foram homogeneizados 600 µL de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0), 200 µL do extrato



enzimático e 200 µL de reagente de Bradford (250 mg de corante Coomassie Brillant Blue G-250, 125 mL de ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) 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 µL de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0) e 200 µL do reagente. A absorbância foi plotada em curva padrão para proteína. Os resultados foram expressos em mg proteína.g tecido<sup>-1</sup>.

A atividade de peroxidases foi determinada em espectrofotômetro pela medida da conversão do guaiacol em tetraguaiacol a 470 nm (LUSSO; PASCHOLATI, 1999). Para tanto, a mistura de reação foi constituída de 0,2 mL de extrato enzimático e 2,8 mL do substrato para enzima (306 µL 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 1 minuto. 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.min<sup>-1</sup>mg proteína<sup>-1</sup>.

A atividade das polifenoloxidasas (PFO) foi determinada quantificando a oxidação do catecol (fenol) convertido em quinona a 420 nm (DUANGMAL; APENTEN, 1999). A reação ocorreu adicionando-se 900 µL de substrato enzimático (Catecol 0,02 M dissolvido em fosfato de potássio 0,1 M (pH 6,8)) a 100 µL de extrato enzimático. As leituras foram realizadas por um período de 2 minutos. A diferença entre a leitura no primeiro minuto e a leitura inicial foi utilizada para a determinação da atividade. Os resultados foram expressos em absorbância min<sup>-1</sup>mg de proteína<sup>-1</sup>.

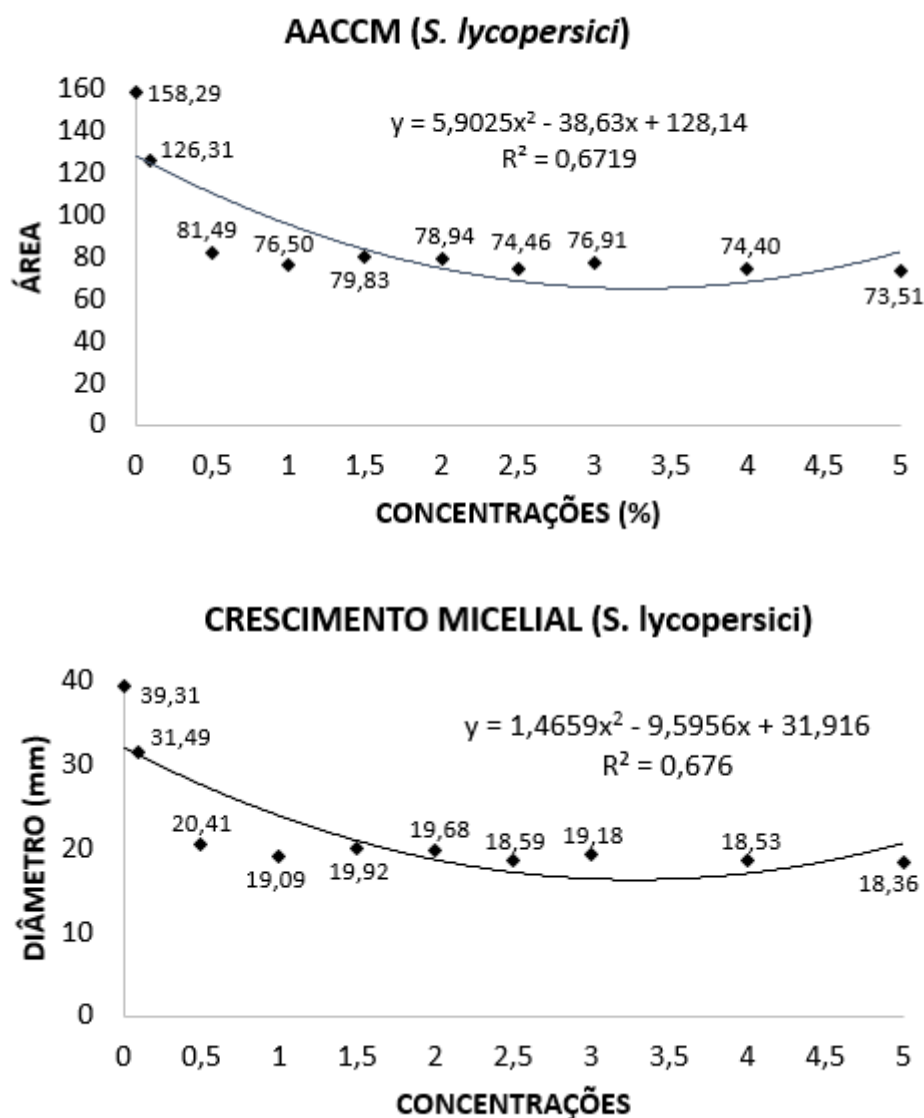
Todos bioensaios foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado (DIC), sendo 4 e 5 repetições para os tratamentos *in vitro* e *in vivo*, respectivamente. Os resultados obtidos foram submetidos inicialmente a testes de normalidade e homogeneidade, sendo transformados quando necessário. Os resultados foram submetidos à análise de variância e análise de regressão ou teste de médias de Tukey a 5% de probabilidade para os dados qualitativos, com auxílio do programa computacional Sisvar (FERREIRA, 2007).

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no experimento *in vitro* com o fungo *Septoria lycopersici* encontram-se nas Figuras 1A, 1B e 2. Os dados obtidos para o crescimento micelial foram utilizados para calcular a área abaixo da curva de crescimento micelial (AACCM). Conforme o exposto na Figura 1A observa-se que com o aumento das concentrações do óleo essencial de *B.*

*dracunculifolia*, ocorreu a diminuição dos valores de AACCM que se tornaram constantes a partir da concentração de 1%. Apesar de ser um valor adimensional, a AACCM ajuda a entender o crescimento micelial a partir das doses utilizadas em cada tratamento. Por meio da equação de segundo grau obtida, calculou-se o ponto de mínima da AACCM de 65,81 e concentração de 3,26%.

**Figura 1: A** - Área Abaixo da Curva de Crescimento Micelial (AACCM) e **B** - Crescimento micelial de *Septoria lycopersici* em diferentes concentrações de emulsão de óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia*.



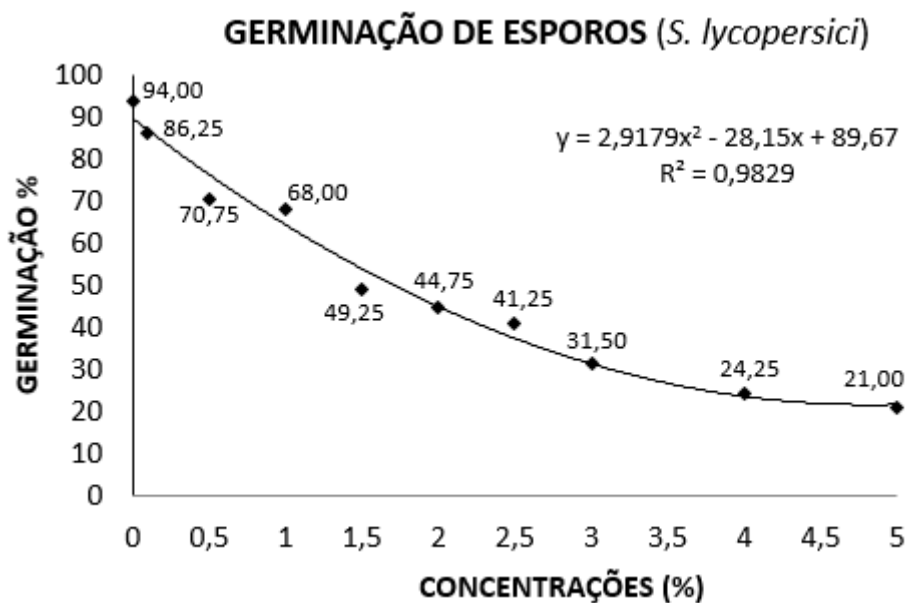
Para o crescimento micelial (Figura 1B), observa-se que ocorreu maior crescimento nos tratamentos em que a concentração do OE foi mais baixa, entre 0 e 1,0%. Em pesquisa realizada

por Fonseca et al., (2015a) observou-se diminuição no crescimento micelial de 6 diferentes fungos fitopatogênicos em meio de cultura obtendo extrato aquoso e etanólico de *Baccharis dracunculifolia*, mostrando o efeito inibitório desta planta sobre o desenvolvimento de patógenos assim como observado neste experimento.

Os resultados observados para o crescimento micelial corroboram com os obtidos por Fonseca et al. (2015b), que obteve menor crescimento micelial de fungos em meio de cultura com a aplicação do óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia*. Em pesquisa realizada por Pedrotti, Ribeiro e Shwambach (2019), observou-se efeito fungistático do óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* sobre *Botrytis cinerea* e *Colletotrichum acutatum*, mostrando desta maneira o efeito do óleo assim como foi observado no presente estudo.

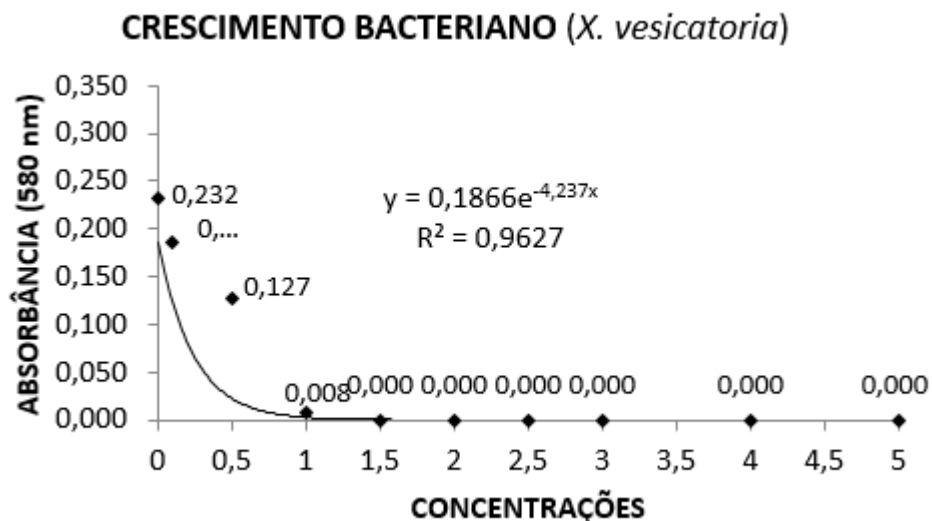
Conforme a Figura 2 que contém os resultados do teste de Elisa, observa-se que nos tratamentos em que a concentração do OE foi mais alta ocorreu menor germinação de esporos. Estes resultados sugerem um possível efeito fungitóxico do OE de *B. dracunculifolia* sobre a germinação de esporos de *S. lycopersici*, pois nos tratamentos com menor concentração e na testemunha, houve maior porcentagem de esporos germinados. Lopes (2018) avaliou a atividade antifúngica de extrato etanólico de própolis (EEP) sobre a germinação de esporos de *S. lycopersici* obtendo efeito inibitório direto conforme o aumento da concentração do produto em contato com os esporos.

**Figura 2:** Germinação de esporos de *Septoria lycopersici* em diferentes concentrações de emulsão de óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia*.



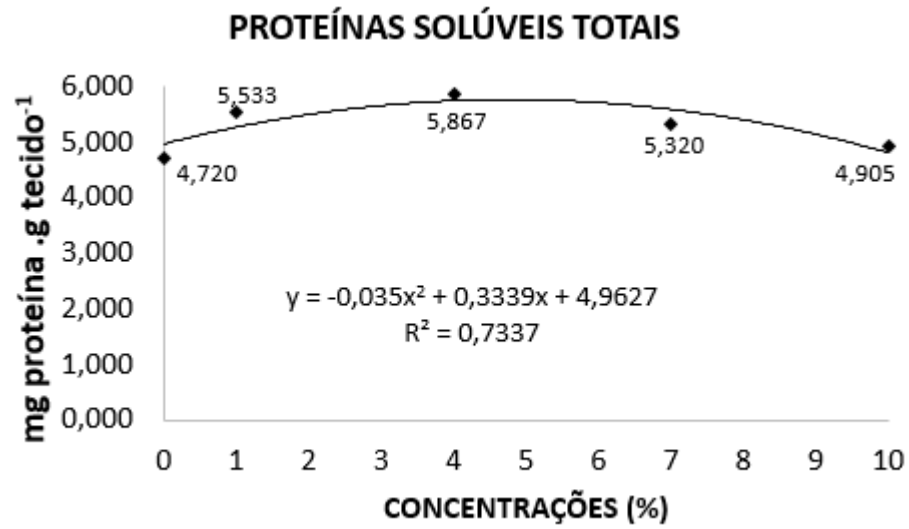
Em relação ao efeito do OE de *Baccharis dracunculifolia* sobre a bactéria *Xanthomonas vesicatoria* (Figura 3), observa-se que os tratamentos com concentração a partir de 1,5% apresentaram absorvância igual a zero, indicando não haver crescimento bacteriano. Efeito contrário foi observado nas concentrações inferiores a 1,5%, sugerindo que o óleo essencial teve efeito inibitório sobre *Xanthomonas vesicatoria*.

**Figura 3:** Crescimento bacteriano de *Xanthomonas vesicatoria* em diferentes concentrações de emulsão de óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia*.

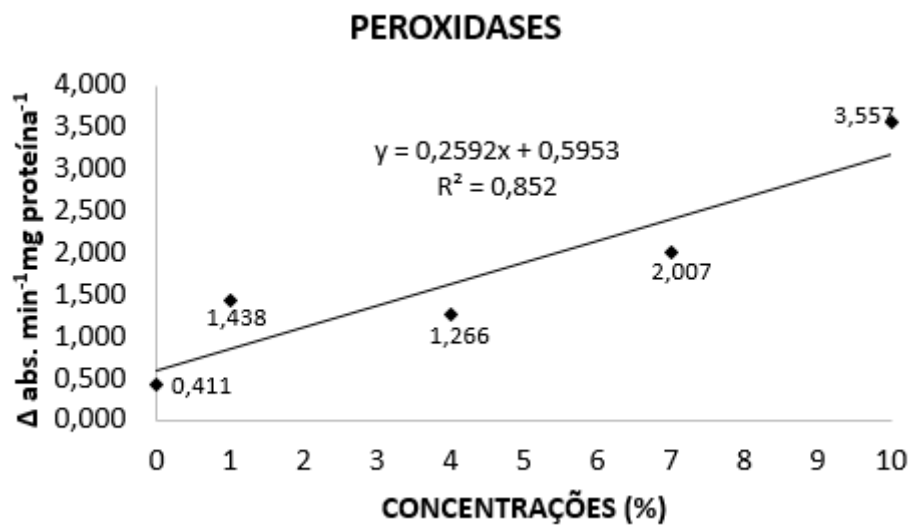


Com relação a atividade enzimática, verifica-se que no tratamento com a concentração 4% maior teor de proteínas solúveis totais (Figura 4). Observa-se um aumento crescente nas atividades das peroxidases (Figura 5) e polifenoloxidasas (Figura 6) até a concentração máxima de 10%. Segundo Campos e Silveira (2003), o aumento na atividade da peroxidase em tecidos infectados é um importante fator de resistência de plantas a doenças, pois estas enzimas atuam na parede celular produzindo compostos necessários a lignificação e espessamento da parede celular vegetal, garantindo maior resistência de células e tecidos vegetais ao ataque de patógenos. Da mesma forma, aumento nas atividades das polifenoloxidasas na resistência a doenças, é devido à propriedade oxidativa de compostos fenólicos em quinonas que são altamente tóxicos aos patógenos no controle de infecções, além da produção de taninos que formam complexos com proteínas formando barreiras físicas contra penetração de patógenos.

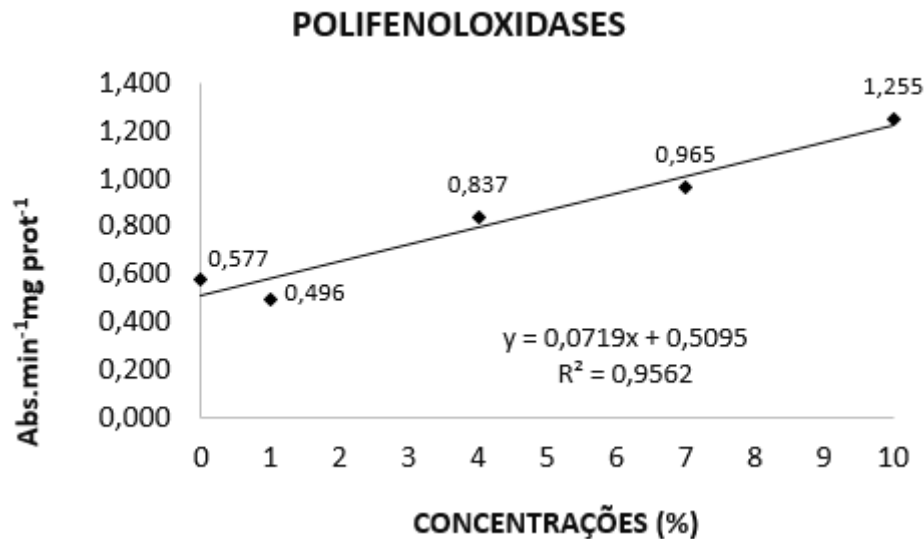
**Figura 4:** Proteínas Solúveis Totais de *Solanum lycopersicum* tratados com diferentes concentrações de emulsão de óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia*.



**Figura 5:** Enzimas Peroxidases de *Solanum lycopersicum* tratados com diferentes concentrações de emulsão de óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia*.



**Figura 6:** Enzimas Polifenoloxidasas de *Solanum lycopersicum* tratados com diferentes concentrações de emulsão de óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia*.



A utilização da emulsão do OE de Alecrim-do-campo quando aplicado às plantas, garante proteção superficial de contato agindo como barreira química no controle dos patógenos pois reduz drasticamente o crescimento bacteriano de *X. vesicatoria* e diminui o potencial de germinação de esporos e crescimento das hifas de *S. lycopersici*, o que corrobora com os resultados encontrados por Fonseca (2015), que utilizou este mesmo OE no controle do crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*, *Fusarium solani* f.sp. *phaseoli*, *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* e *Sclerotinia minor*.

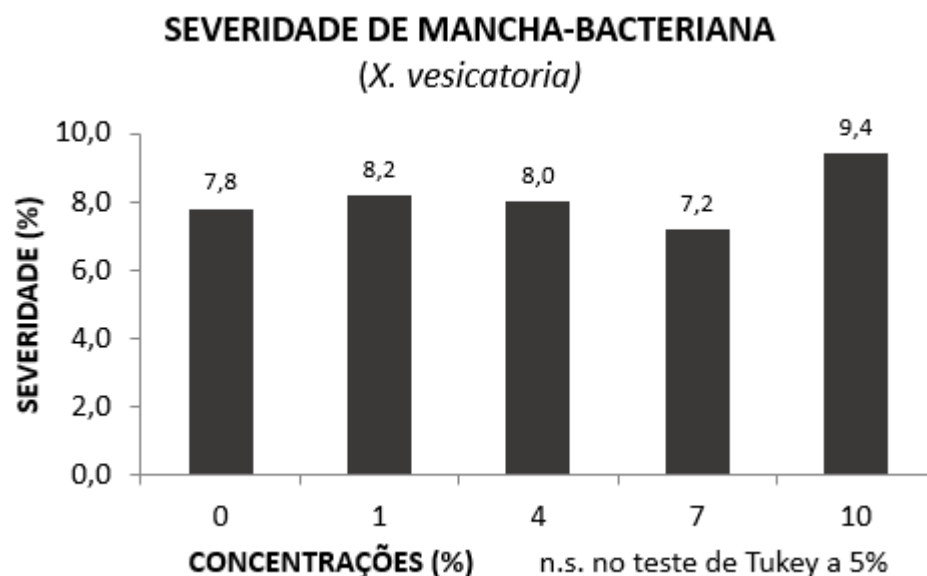
A utilização da emulsão do OE garante também o aumento na concentração de proteínas solúveis totais e o aumento na atividade das enzimas oxidativas na produção de compostos que atuam como barreiras químicas e físicas, impedindo a colonização e desenvolvimento dos patógenos no tomateiro. O efeito de aumento na produção de fenóis e consequentemente das quinonas, polímeros e taninos são respostas vegetais a estresses sofridos por patógenos ou pragas (NACZK; SHAHIDI, 2004). Observa-se que os resultados de proteínas solúveis totais, peroxidases e polifenoloxidasas apresentaram valores máximos sem danos de fitotoxidez às plantas em doses superiores às necessárias para controlar o desenvolvimento dos patógenos *in vitro*. Deste modo pode-se considerar que a utilização da emulsão do óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* para o controle de *Septoria lycopersici* e *Xanthomonas vesicatoria* apresentou resultados satisfatórios.

O decréscimo na quantidade de proteínas solúveis totais e contínuo aumento na

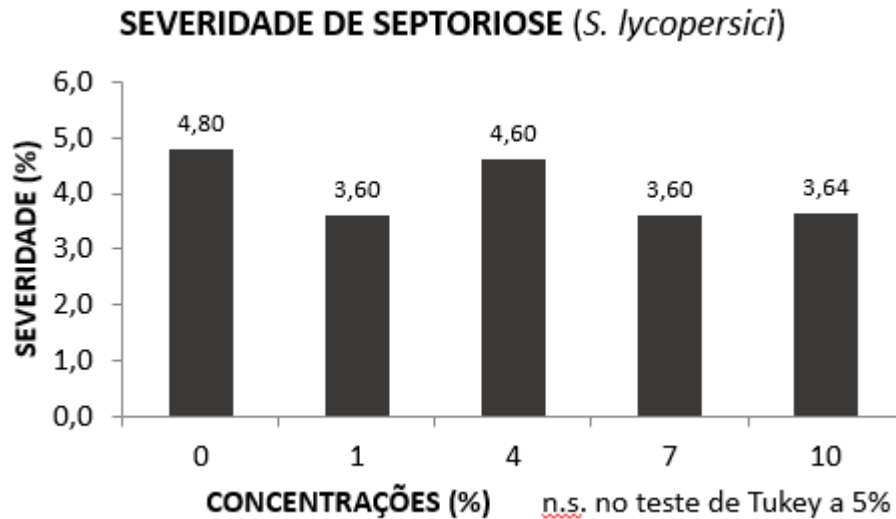
atividade das enzimas peroxidases e polifenoloxidasas pode se dar devido ao efeito fitotóxico do aumento da concentração de OE de *B. dracunculifolia* causando maior estresse às plantas que resultou em maior atividade destas enzimas. Para Shah et al. (2018), o tipo de estímulo inicial causado por fermentos, patógenos, pragas ou elicitores pode ativar diferentes rotas metabólicas. Patógenos como *Xanthomonas* spp, conseguem infectar plantas injetando proteínas de virulência (*Xanthomonas outer proteins*) que atrasam a resposta de defesa da planta (FACCIN, 2022). Plantas de tomateiro tratadas com a emulsão do OE de Alecrim-do-campo apresentaram maiores taxas de enzimas de defesa e compostos atuantes como barreira química e física a *Xanthomonas vesicatoria*.

Para os ensaios de severidade de mancha-bacteriana (Figura 7) e septoriose (Figura 8), observa-se que não houve diferença entre as médias dos tratamentos que foram submetidos ao teste de Tukey a 5% de probabilidade. Verifica-se no ensaio para severidade de mancha bacteriana as concentrações com menor e maior eficácia foram 10 e 7%, respectivamente. De forma semelhante, o ensaio de septoriose apresentou maior e menor eficácia as concentrações 0 e 7%, respectivamente. Estes resultados diferem dos encontrados por Araújo e Tebaldi (2019), onde a aplicação de óleos essenciais de *Melissa officinalis* e *Syzygium aromaticum* diminuíram a incidência e severidade de *Xanthomonas* spp.

**Figura 7:** Severidade de mancha-bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria*) em plantas de tomateiro (*Solanum lycopersicum*) tratados com diferentes concentrações de emulsão de óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia*.



**Figura 8:** Severidade de septoriose (*Septoria lycopersici*) em plantas de tomateiro (*Solanum lycopersicum*) tratados com diferentes concentrações de emulsão de óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia*.



Em pesquisa realizada por Lucas (2009), obteve-se controle da mancha bacteriana causada por *Xanthomonas vesicatoria* quando a aplicação de óleos essenciais de *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon nardus* e *Melaleuca, alternifolia* foi realizada 7 dias antes da inoculação com *Xanthomonas vesicatoria* e semanalmente após a inoculação. Isto não foi feito no presente estudo o que pode ser uma das causas do não controle da doença, pois a aplicação das diferentes concentrações de óleo essencial foi realizada 72 horas antes da inoculação. Santos Neto et al. (2012), verificou a capacidade de inibição direta de septoriose com utilização de OE de capim-limão (*Cymbopogon citratus*) em concentração de 10 µl/mL de calda diretamente sobre plantas de tomateiro.

Os resultados evidenciam redução no teor de proteínas totais a partir do ponto de máximo do gráfico em torno de 5%, havendo redução a partir desse valor que indica possível fitotoxidez que é verificável nas enzimas de defesa Peroxidases e Polifenoloxidasas que apresentaram atividade crescente conforme o aumento da concentração. A concentração 5% também apresentou eficácia sobre a germinação de esporos e crescimento micelial de *S. lycopersici* e em menor concentração promoveu o controle total de *X. vesicatoria* nos ensaios *in vitro*.



## 5. CONCLUSÃO

A emulsão do óleo essencial (OE) de *Baccharis dracunculifolia* promoveu menor germinação de esporos de *Septoria lycopersici* na concentração de 5%.

Para o crescimento micelial e AACCM conclui-se que da mesma forma que a germinação de esporos as maiores concentrações de óleo essencial promoveram menor taxa de crescimento do fungo *Septoria lycopersici*.

Para os testes com *Xanthomonas vesicatoria*, observou-se que o crescimento bacteriano cessou completamente a partir da concentração de 1,5% de emulsão do OE de *Baccharis dracunculifolia*.

Para os tratamentos *in vivo* verificou-se o aumento no teor de proteínas totais até a dose 5% de emulsão do OE de *Baccharis dracunculifolia* e aumento das atividades enzimáticas de peroxidases e polifenoloxidasas conforme aumento das concentrações testadas.

A concentração de 5% apresentou melhor efeito na indução de mecanismos de defesa em tomateiro e controle de patógenos. Estes resultados evidenciam a necessidade de mais estudos com outras cultivares e sistemas de cultivo na cultura do tomateiro.

## 6. REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, V. C.; TEBALDI, N. D. Intervalo de aplicação de óleos essenciais no controle da mancha bacteriana do tomateiro. **Summa Phytopathologica**, v. 45, p. 210-212. Fev. 2019.
- BIZZO, Humberto R.; HOVELL, Ana Maria C.; REZENDE, Claudia M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química nova**, v. 32, p. 588-594, 2009.
- CAMPOS, A. D. Considerações sobre indução de resistência a patógenos em plantas. **Embrapa Clima Temperado-Documentos (INFOTECA-E)**, 2009.
- CAMPOS, A. D.; SILVEIRA, E. M. L. Metodologia para determinação da peroxidase e da polifenoloxidase em plantas. **Comunicado técnico 87 - MAPA**. Pelotas-RS, 2003. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/744473/1/comunicado87.pdf>>
- CAVALCANTI, F. R.; RESENDE, M. L. V.; CARVALHO, C. P. S.; SILVEIRA, J. a. G.; OLIVEIRA, J. T. a. Induced defence responses and protective effects on tomato against *Xanthomonas vesicatoria* by an aqueous extract from *Solanum lycocarpum* infected with *Crinipellis pernicioso*. **Biological Control**, v. 39, n. 3, p. 408–417, dez. 2006.
- DUANGMAL, K.; APENTEN, R.K.O. A comparative study of polyphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanun tuberosum* var. *Romano*). **Food Chemistry**, v.64, p.351-359, 1999
- DUARTE, Simone et al. Effect of a novel type of propolis and its chemical fractions on glucosyltransferases and on growth and adherence of mutans streptococci. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 26, n. 4, p. 527-531, 2003.
- FACCIN, D. et al. Compostos naturais como bioestimulantes e indutores de resistência à mancha bacteriana em plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.). **Repositório UFSC**, 2022.
- FERREIRA, D. F. **SISVAR: Sistema de análise de variância para dados balanceados, versão 5.0**. Lavras: DEX/UFLA, 2007. CD-ROM. Software.
- FERRONATTO, R.; MARCHESAN, E. D.; PEZENTI, E.; BEDNARSKI, F.; ONOFRE, S. B. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* D.C. e *Baccharis uncinella* D.C. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 2, p. 224–230, 2007
- FONSECA, M. C. M., et al. Antifungal activity of plant extracts on common bean pathogens. **Acta Horticulture**, v.1098, p.159-164, set. 2015a.
- FONSECA, M. C. M., et al. Potencial de óleos essenciais de plantas medicinais no controle de fitopatógenos. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 17, p. 45-50, 2015b.

GELINSKI, J. M. L. N., et al. Atividade antibacteriana do óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) e de seu composto ativo nerolidol em combinação ao EDTA ou lisozima. **Evidência**, v. 7, n. 2, p. 131-144, 2007.

HEIMBACH, N. S., et al. Resíduo da extração de própolis como inibidor bacteriano in vitro. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 17, p. 65-72, 2016.

HUET, R. Citrus essential oils. *Fruits*, v. 46, n. 4, p. 501-513, 1991.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. Rio de Janeiro, 2017. Disponível em: <ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao\_Agricola/Levantamento\_Sistemático\_da\_Producao\_Agricola\_[mensal]/Fasciculo/lspa\_2017\_01.pdf.

INOKUCHI, Y. et al. Brazilian green propolis protects against retinal damage in vitro and in vivo. **Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM**, v. 3, n. 1, p. 71-7, mar. 2006.

INOUE-NAGATA, A.K. et al. Doenças do tomateiro. In: AMORIM, L. et al. (Eds.). **Manual de Fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. 4. ed. Ouro Fino-MG: **Agronômica Ceres**, v. 2, p. 697- 731, 2016.

KUHN, O.J. **Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-S-metil e *Bacillus cereus*: aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de crescimento e produção**. Piracicaba, 2007. Tese (Doutorado em Agronomia). ESALQ – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

LOPES, C.A.; DE ÁVILA, A. C. Doenças do tomateiro. **Embrapa Hortaliças-Livro técnico (INFOTECA-E)**, 2005.

LOPES, J., R.. Extrato etanólico de própolis no controle alternativo da pinta preta (*Alternaria solani*) e septoriose (*Septoria lycopersici*) na cultura do tomateiro. 2018.

LUCHESE, A. L., et al. Chemical composition, antifungal and antioxidant activity of essential oils from *Baccharis dracunculifolia* and *Pogostemon cablin* against *Fusarium graminearum*. **Natural Product Research**, vol. 36. p.849-852, ago. 2020

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.

LUCAS, G. C. **Óleos essenciais no controle da mancha bacteriana do tomateiro**. 93p. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2009

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

MOREIRA, HJ da C.; BRAGANÇA, HORLANDEZAN BELIRDES NIPPES. Manual de identificação de plantas infestantes. **FMC Agricultural Products, Campinas, 1017p**, 2011.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography, Amsterdam**, v. 1054, n. 1-2, p. 95-111, 2004.

PARAOUL, N., et al. Composição química e atividade antioxidante de *Baccharis trimera* Pers e *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae). **Rev. Perspectiva**, vol. 40, n.151, p.55-64. Set. 2016.

PEDROTTI, C.; RIBEIRO, R., T., S.; SCHWAMBACK, J. Control of postharvest fungal rots in grapes through the use of *Baccharis trimera* and *Baccharis dracunculifolia* essential oils. **Crop Protection**, vol. 125. Nov. 2019.

DE MORAIS, Lilia Aparecida Salgado. Óleos essenciais no controle fitossanitário. **Embrapa Meio Ambiente-Capítulo em livro científico (ALICE)**, 2009.

SANTOS, C. A. dos.; COSTA, E. S. P.; CARMO, M. G. F. do. Tomato late blight: Severity and losses in different cultivars in organic system. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**. v.12, Nº 1, p. 156-160, 2017.

SANTOS NETO, J. **Bioatividade de subprodutos de capim-limão e proteção do tomateiro, em sistema de cultivo orgânico, contra septoriose**. 2012. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Maringá.

SERAFINI, L. A.; CASSEL, E. Produção de óleos essenciais: uma alternativa para a agroindústria nacional. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. Biotecnologia na agricultura e na agroindústria. Guaíba: Agropecuária, 2001.

SFORCIN, J. M.; BANKOVA, V. Propolis: is there a potential for the development of new drugs? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, n. 2, p. 253–60, 27 jan. 2011.

SHAH, Z. H.; REHMAN, H. M; AKHTAR, T.; ALSAMADANY, H.; HAMOOH, B. T.; MUJTABA, T.; DAUR, I.; AL ZAHIRANI, Y.; ALZAHIRANI, H. A. S.; ALI, S.; YANG, S. H.; CHUNG, G. (2018) Humic Substances: Determining Potential Molecular Regulatory Processes in Plants. **Front. Plant Sci.** 9:263. doi: 10.3389/fpls.2018.00263.

SIANI, A. C. Óleos essenciais. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 2, p. 38-43. Brasil. 2000.

SILVA. E.A.J. **Óleo essencial das folhas de *Psidium guajava*: controle de *Sclerotinia sclerotiorum* em soja, atividade bactericida e anticariogênica**. Tese de Doutorado. Rio Verde-GO. 73p. 2019.

SILVA, J. O. et al. Métodos de avaliação de severidade de septoriose no tomateiro e eficácia de fungicidas. 2018.

SILVA, J.B. C., et al. Cultivo de Tomate para Industrialização. Embrapa Hortaliças, 1ª ed. Dez. 2006.

SMITH, C.J. Accumulation of phytoalexins: defense mechanisms and stimulus response system. **The New Phytologist**, v. 132, p.1-45, 1996.

SOARES, K. A. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de extrato de Alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*) sobre bactérias Gram negativas e Gram positivas. **Ensaio e Ciência C Biológicas Agrárias e da Saúde**, v. 17, n. 4, 2013.

STEFFENS, A. H. **Estudo da composição química dos óleos essenciais obtidos por destilação por arraste a vapor em escala laboratorial e industrial**. 2010. Dissertação de Mestrado. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

TERRY, L.A.; JOYCE, D.C. Elicitors of induced disease resistance in posharvest horticultural crops: a brief review. **Postharvest Biology and Technology**, v.32, p.1-13, 2004.