

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE MESTRADO**

***Lippia alba* (Mill) N. Brown ASSOCIADA ao *Trichoderma spp.*: BIOMASSA,
ÓLEO ESSENCIAL E ATIVIDADE ANTIFÚNGICA**

VANESSA FERREIRA DE JESUS

**CRUZ DAS ALMAS / BAHIA
SETEMBRO DE 2020**

***Lippia alba* (Mill) N. Brown ASSOCIADA ao *Trichoderma*: BIOMASSA, ÓLEO
ESSENCIAL E ATIVIDADE ANTIFÚNGICA**

Vanessa Ferreira de Jesus

Eng.^a Agrônoma

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2017

Dissertação apresentada ao
colegiado do Programa de
Pós-Graduação em Ciências
Agrárias da Universidade
Federal do Recôncavo da
Bahia, como requisito parcial
para a obtenção do Título de
Mestre em Ciências Agrárias
(Área de Concentração:
Fitotecnia).

Orientadora: Profa. Dra. Franceli da Silva

**CRUZ DAS ALMAS / BAHIA
SETEMBRO DE 2020**

FICHA CATALOGRÁFICA

J58l	<p>Jesus, Vanessa Ferreira de. <i>Lippia alba</i> (Mill) N. Brown associada ao <i>Trichoderma spp.</i>: biomassa, óleo essencial e atividade antifúngica / Vanessa Ferreira de Jesus._ Cruz das Almas, Bahia, 2020. 61f.; il.</p> <p>Orientadora: Franceli da Silva.</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Mestrado em Ciências Agrárias.</p> <p>1.Plantas medicinais – Erva cidreira – Cultivo. 2.Erva cidreira – Óleos essenciais. 3.Fungos fitopatogênicos – Análise. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.</p> <p>CDD: 581.634</p>
------	---

Ficha elaborada pela Biblioteca Universitária de Cruz das Almas - UFRB.
Responsável pela Elaboração - Antonio Marcos Sarmiento das Chagas (Bibliotecário - CRB5 / 1615).
(os dados para catalogação foram enviados pelo usuário via formulário eletrônico).

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Dados de precipitação, temperatura máxima e mínima. Médias entre Março e Agosto de 2019 em Cruz das Almas (Dados fornecido pela Embrapa Mandioca e Fruticultura – Cruz das Almas-BA).**28**
- FIGURA 2.** Equipamento Clevenger utilizado para hidrodestilação do óleo essencial.....**31**
- FIGURA 3.** Esquema experimental.....**33**
- FIGURA 4.** Diâmetro inicial e final de mudas de *Lippia alba* cultivadas em casa de vegetação sob ações sucessivas de diferentes isolados de *Trichoderma spp.*.....**34**
- FIGURA 5.** Efeito de diferentes concentrações dos óleos essenciais de *Lippia alba*, submetidas ao tratamento com diferentes isolados de *Trichoderma spp.* no índice de velocidade de crescimento micelial (cm.dia⁻¹) (A); Porcentagem de inibição do crescimento micelial (%) (B); Números de esporos.cm² (C); Germinação de esporos (%) (D) do fitopatógeno *Aspergillus welwitschiae*.....**51**
- FIGURA 6.** Efeito de diferentes concentrações dos óleos essenciais de *Lippia alba*, submetidas ao tratamento com diferentes isolados de *Trichoderma spp.* no índice de velocidade de crescimento micelial (cm.dia⁻¹) (A); Porcentagem de inibição do crescimento micelial (%) (B); Germinação de esporos (%) (C) do fitopatógeno *F. oxysporum* f. sp. cubense.....**52**
- FIGURA 7.** Crescimento micelial de *Aspergillus welwitschiae*, após 4 dias de incubação em meio de cultura com a adição de diferentes óleos essenciais de *Lippia alba*, em seis concentrações. Óleo essencial extraído de *Lippia alba*, sem inoculação de *Trichoderma spp.* (A); Óleo essencial extraído de *Lippia alba*, com inoculação do isolado TCS85. (B); Óleo essencial extraído de *Lippia alba*, com inoculação do isolado TCS29 (C); Óleo essencial extraído de *Lippia alba*, com inoculação do isolado TCS87 (D).....**55**
- FIGURA 8.** Crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense, após 7 dias de incubação em meio de cultura com a adição de diferentes óleos essenciais de *Lippia alba*, em seis concentrações. Óleo essencial extraído de *Lippia alba*, sem inoculação de *Trichoderma spp.* (A); Óleo essencial extraído de *Lippia alba*, com inoculação do isolado TCS85. (B); Óleo essencial extraído de *Lippia alba*, com inoculação do isolado TCS29 (C); Óleo essencial extraído de *Lippia alba*, com inoculação do isolado TCS87 (D).....**55**

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1.** Produção de biomassa da de plantas de *Lippia alba* cultivadas em casa de vegetação com aplicação de diferentes isolados de *Trichoderma spp.* MFF= Massa Fresca das Folhas; MFC= Massa Fresca do Caule; MFTPA: Massa Fresca Total da Parte Aérea; MSF: Massa Seca das Folhas; MSC: Massa Seca do Caule; MSR: Massa Seca da Raiz; MST: Massa seca total.....**35**
- TABELA 2.** . Teor (%) de óleo essencial extraído de plantas frescas e secas de *Lippia alba* e sem aplicação de diferentes isolados de *Trichoderma spp.* cultivadas em casa de vegetação.....**37**
- TABELA 3.** Produção de biomassa da de plantas de *Lippia alba* cultivadas em campo com e sem aplicação de diferentes isolados de *Trichoderma spp.* MFF= Massa fresca da folha; MSF= Massa Seca das Folhas; NHASTE= Número de Hastes; NFOLHAS= Número de Folhas; MFBF= Massa Fresca do Botão Floral; MFC= Massa fresca do caule; MSC= Massa Seca do Caule; MSBF= Massa Seca do Botão Floral; MSR= Massa Seca da Raiz;.....**38**
- TABELA 4.** Teor (%) de óleo essencial extraído de folhas secas de *Lippia alba* submetidas ao tratamentos com e sem aplicação de diferentes isolados de *Trichoderma spp.* cultivadas em campo.....**39**
- TABELA 5.** Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) do óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown submetida à inoculação de diferentes isolados de *Trichoderma spp.* contra o fungo *Aspergillus welwitschiae* e *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense.**50**

SUMÁRIO

Página

LISTA DE FIGURAS LISTA DE TABELAS

RESUMO.....	7
REFERENCIAL TEÓRICO.....	8
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	17

ARTIGO 1

BIOMASSA E TEOR DE ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown COM INOCULAÇÃO DE *Trichoderma spp.* CULTIVADAS EM CASA DE VEGETAÇÃO E CAMPO

INTRODUÇÃO.....	27
MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
CONCLUSÃO.....	39
AGRADECIMENTO.....	40
REFERÊNCIAS.....	40

ARTIGO 2

ATIVIDADE ANTIFUNGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown EM *Aspergillus welwitschiae* E *Fusarium oxysporum f sp. cubense*

INTRODUÇÃO.....	46
MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
CONCLUSÃO.....	56
AGRADECIMENTOS.....	57
REFERÊNCIAS.....	57

***Lippia alba* (Mill) N. Brown ASSOCIADA ao *Trichoderma*: BIOMASSA, ÓLEO ESSENCIAL E ATIVIDADE ANTIFÚNGICA**

Resumo: A *Lippia alba* é uma espécie medicinal com grande aplicabilidade em diversos segmentos industriais, além de desenvolver papéis fundamentais quando inseridas em agroecossistemas. Seu potencial no tratamento de doenças e na produção de óleo essencial tem sido alvo de diferentes estudos, entretanto, pensar em formas de manejo sustentável a exemplo da inserção de microrganismos benéficos que promova o crescimento da planta e valide o seu potencial biológico são essenciais. Essa pesquisa foi realizada visando analisar a influência de isolados de *Trichoderma spp.* na biomassa e no teor do óleo essencial de plantas de *L. alba* cultivadas em casa de vegetação e em campo na cidade de Cruz das Almas-BA, e avaliar o efeito do óleo essencial no controle dos fitopatogênicos *Aspergillus welwitschiae* e *Fusarium oxysporum sp. cubense* agentes epidemiológico da podridão vermelha do sisal e mal do Panamá em bananeira, respectivamente. Verificou-se que o uso *Trichoderma* no cultivo mudas de *Lippia alba* promoveu o incremento das variáveis massa seca do caule e massa fresca da folha, porém, para essa variável as mudas do tratamento controle se destacaram. O teor de óleo essencial nas mudas tratadas com *Trichoderma* foi inferior, demonstrando uma adaptação da planta ao ambiente, não levando a condições de estresse. As plantas frescas apresentam uma maior quantidade de óleo essencial, afirmando que o processo de secagem ocasiona a perda do óleo essencial pela volatilidade. No cultivo em campo os isolados de *Trichoderma* estimulou o maior desenvolvimento de hastes, maior número de folha, e a maior biomassa de raízes foi verificada nas plantas que foram tratadas com os isolados TCS29. Não houve diferença no teor do óleo essencial. Os óleos essenciais apresentaram atividade antifúngica contra os fitopatogênicos estudados, com efeito fungicida para *A. welwitschiae* e fungistática para *F. oxysporum*, validando que o óleo essencial da *Lippia alba* pode ser promissor no controle dessas doenças e pode constituir de novos produtos antifúngicos, entretanto é necessário o teste “*in vivo*” já que o comportamento pode mudar com outros fatores atuando simultaneamente.

Palavras-chave: Cultivo sustentável, controle biológico, erva cidreira

Lippia alba (Mill) N. Brown ASSOCIATED with *Trichoderma* spp: BIOMASS, ESSENTIAL OIL AND ANTIFUNGAL ACTIVITY

Abstract: *Lippia alba* is a medicinal species with great applicability in several industrial segments, in addition to developing fundamental roles when inserted in agroecosystems. Its potential in the treatment of diseases and in the production of essential oil has been the subject of different studies, however, thinking about ways of sustainable management such as the insertion of beneficial microorganisms that promote plant growth and validate its biological potential are essential. This research was carried out aiming to analyze the influence of *Trichoderma* spp. on biomass and essential oil content of *L. alba* plants grown in a greenhouse and field in the city of Cruz das Almas-BA, and to evaluate the effect of essential oil on the control of phytopathogens *Aspergillus welwitschiae* and *Fusarium oxysporum* sp. Cuban epidemiological agents of red sisal rot and Panama disease in banana, respectively. It was found that the use of *Trichoderma* in the cultivation of *Lippia alba* seedlings promoted the increase of the dry mass of the stem and fresh weight of the leaf, however, for this variable, the seedlings of the control treatment stood out. The essential oil content in the seedlings treated with *Trichoderma* was lower, showing an adaptation of the plant to the environment, not leading to stress conditions. Fresh plants have a greater amount of essential oil, stating that the drying process causes the loss of essential oil due to volatility. In field cultivation, the *Trichoderma* isolates stimulated the greatest stem development, the largest number of leaves, and the highest root biomass was found in the plants that were treated with the TCS isolates²⁹. There was no difference in the content of the essential oil. The essential oils showed antifungal activity against the studied phytopathogens, with a fungicidal effect for *A. welwitschiae* and fungistatic for *F. oxysporum*, validating that the essential oil of *Lippia alba* can be promising in the control of these diseases and may constitute new antifungal products, however it is “in vivo” testing is necessary as the behavior can change with other factors acting simultaneously.

Keyword: sustainable cultivation, biological control, lemon balm

REFERENCIAL TEÓRICO

INTERAÇÃO PLANTA X MICRORGANISMO

As interações biológicas existentes nos ecossistemas possuem papel fundamental por garantir a perpetuação das espécies de plantas, animais ou outros seres vivos (GONÇALVES, 2015; LOVATTO et al., 2012; BROWN, 2002). Estas por sua vez, possuem interferência direta das condições ambientais (REIS, 2005). No solo, a diversidade microbiana existente, possibilita o equilíbrio dinâmico, podendo acarretar em melhorias na estrutura física, química e biológica, a exemplo da ciclagem de nutrientes, atividades metabólicas, biorremediadores de solos contaminados, retenção e disponibilidade de água e nutrientes que são indispensáveis no funcionamento sustentável do agroecossistema (MOREIRA et al., 2018; BENINTENDE et al., 2008).

A porção do solo que é influenciada pelas raízes das plantas é definida como rizosfera, local preferido para a colonização de microrganismo pelo fato da sua composição ser diferenciada quando comparada com a outra parcela de solo. Fatores como as mudanças no pH, absorção de nutrientes e água, a exsudação de ácidos orgânicos contribuem com o metabolismo e a multiplicação desses microrganismo garantindo a intensa atividade microbiológica, levando a disponibilidades de elementos essenciais no desenvolvimento das plantas, como os macro e micronutrientes (DRIGO et al., 2010; BRACCINI et al., 2000).

Dentre os microrganismos existentes na microfauna do solo, podem ser encontrados os benéficos, prejudiciais e neutros (MELO, 2001). A exemplo dos benéficos estão as bactérias diazotróficas, micorrizas e actinomicorrizas que são capazes de fixar nitrogênio disponibilizando para planta (DANTAS, et al., 2009) e pela sua capacidade de sintetizar hormônios de crescimento. Os prejudiciais quando em quantidade maiores são capazes de causar alguma patologia no vegetal. Além disso, os microrganismos servem de indicadores importantes na qualidade do solo (FERREIRA, et al., 2017)

Além das interações intra/interespecíficas que são encontrados na rizosfera ou solo, as plantas também apresentam microrganismos associados aos seus órgãos vegetais, denominados de fungos endofíticos, estes estão presente em todos os vegetais (FIRÁKOVÁ et al., 2007; STROBEL; DAISY, 2003). Esses fungos

apresentam a capacidade de viver na planta, intercelularmente, sem causar algum tipo de doença (SCHULZ; BOYLE, 2005).

Dado a importância das interações biológicas nos ecossistemas, conhecer a funcionalidade e aumentar a microbiota do solo gera condições favoráveis para o crescimento dos vegetais. O uso de fungos do gênero *Trichoderma* tem sido relatado pelos seus variados mecanismos de ação que podem exercer sobre outro microrganismo e a sua relação no crescimento dos vegetais.

***Trichoderma spp* – ASPECTOS GERAIS E SUA RELAÇÃO NA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE VEGETAIS**

O gênero *Trichoderma* compreendia apenas a fase a anamórfica/assexuada do gênero *Hypocrea*, entretanto, a partir de estudos na relação de parentesco e definição de espécies de fungos, foi observado na árvore genealógica que os agrupamentos e os clados contendo ambos isolados, apresentavam as mesmas características genéticas, comprovando que ambos pertenciam a uma mesma espécie. Sendo assim, a partir de 2013 o gênero *Hypocrea* passou a não ser mais utilizado. (ROSSMAN et al., 2013; CHAVERRI; SAMUELS, 2003; KUHLS et al., 1997).

Esses fungos apresentam alta capacidade em colonizar substratos devido ao seu rápido crescimento (KIRK, 2012; DRUZHININA; KUBICEK, 2005; ESPOSITO; SILVA JUNIOR, 1998). Podem apresentar colônias de diferentes aspectos, com coloração variando de verde ao amarelo. Os conídios variam em tamanho e formato, alguns isolados podem formar clamidósporos (GRESSEL; HARTMANN, 1968), ou produzir odor adocicado que se assemelha a coco, devido a um composto volátil biologicamente ativo 6PP-(6-pentil- α -pirona) (FERON et al, 1996; SAMUELS, 2006).

São fungos saprófitos, pela sua capacidade de decompor matéria orgânica, e com ampla distribuição, sendo facilmente isolado e cultivado de forma *in vitro* (MELO, 1991; ALEXANDER, 1961). Produzem enzimas hidrolíticas de grande importância no desenvolvimento de energias renováveis, gerando etanol de segunda geração a partir de resíduos lignocelulósicos provindos de agroindústrias resultantes da degradação celulose e hemicelulose que constituem a parede celular vegetal (RUEGGER; TAUKNISIELO, 2004; HARMAN et al., 2004).

Esses aspectos podem ser atribuídos a sua variada capacidade metabólica e por ser altamente competitivo, com rápida colonização e conseqüentemente, gerando uma população estável (NACHTIGAL, 2012; ELAD, 2000). É importante ressaltar que

esses microrganismos produzem uma vasta gama de antibióticos e substâncias capazes de parasitar outros fungos (SIVASITHAMPARAM; GHISALBERTI, 1998). Pesquisas comprovam que isolados de *Trichoderma* são práticos, seguros e eficientes quanto aos métodos de aplicação, biocontrole e promoção de crescimento vegetal, no entanto, na prática a sua aplicação ainda é restrita (MACHADO et al., 2012).

Os mecanismos de ação como micoparasitismo, antibiose, competição, interação com a planta e indução de defesas na planta faz com que esses fungos sejam os mais utilizados em pesquisas para entender a sua relação na promoção de crescimento de plantas ou no controle de fitopatógenos (AGUIAR, 2013; BENITEZ et al, 2004). Em pesquisas destinadas a promoção do crescimento vegetal é confirmada a eficácia do *Trichoderma spp* tanto no crescimento, quanto em termos de produção de diversas culturas frutíferas, florísticas, leguminosas e até mesmo as florestais (CHAGAS et al, 2017; MACHADO et al, 2015; CARVALHO et al, 2011; SILVA et al, 2011; FORTES et al, 2007)

Estudos sobre a promoção de crescimento de plantas em associação com o *Trichoderma* ainda são poucos conhecidos em comparação aos relacionados ao controle biológico (POMELLA; RIBEIRO, 2009). O estímulo do *Trichoderma* no crescimento da planta ainda é um mecanismo muito complexo por existirem interações com fatores bioquímicos e produção de diversos bioativos benéficos.

No entanto, já existem relatos quanto a sua capacidade de produzir auxinas e metabólitos que favorecem o desenvolvimento das raízes, evidenciando raízes mais profundas e vigorosas, tolerando déficit hídrico (CONTRERAS-CORNEJO et al.,2009; VINALE et al., 2008; HARMAN, 2000). Reduzem os níveis de etileno nas plantas, devido a presença da enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminase acarretando no crescimento das plantas, aumenta a massa seca, amido, açúcares solúveis em plantas, o verdor das folhas e a eficiência fotossintética, que está associada com a assimilação de nitrogênio. (DOMÍNGUEZ et al., 2016; VITERBO et al., 2010; VARGAS et al., 2009; GRAVEL et al., 2007). O uso do *Trichoderma* também pode possibilitar absorção e a solubilização de nutrientes, favorecendo o desenvolvimento de pelos absorventes nas raízes laterais aumentando a superfície específica de absorção (SAMOLSKI et al., 2012; YEDIDIA et al., 2001).

Diversos isolados de *Trichoderma* tem o potencial de melhorar a utilização de nutrientes pela a planta, favorecendo a resistência desses vegetais contra vários fatores desfavoráveis, além de degradar constituintes essenciais no desenvolvimento da planta (HARMAN et al., 2004b; HARMAN, 2000).

PLANTAS MEDICINAIS NO AGROECOSSISTEMA

O ser humano possui importante papel dentro dos agroecossistemas, sendo o grande regulador nos diferentes sistemas de produção que compõem a produção agrícola (CHAGAS et al., 2016; TEXEIRA, 2007). O agroecossistema vai além das necessidades para manter o próprio ecossistema, ele pressiona pela produtividade, sustentabilidade e equidade e interage com sistemas econômicos e sociais. Entretanto, devido à eliminação de abrigos naturais, levou-se a necessidade da inserção de produtos como fertilizantes, fungicidas, pesticidas, sendo comprovado que insumos químicos reduzem a biodiversidade do sistema (BORSATO; FEIDAN, 2011).

Odum e Barrett (2008) ao avaliar o efeito causado por um inseticida contra insetos fitófagos, percebeu a redução desses insetos em curto prazo, entretanto, esse efeito também acarretou a redução da taxa de decomposição dos resíduos vegetais, o atraso na reprodução do rato de algodão (*Sigmodon hispidus*) e a redução na diversidade de insetos predadores em longo prazo.

A sustentabilidade dentro dos sistemas de produção é induzida com práticas que envolva o manejo adequado dos recursos naturais como a inserção da biodiversidade e o entendimento da sua funcionalidade, visando à qualidade do ambiente, a conservação dos recursos naturais levando a segurança altruísta aos seres vivos (ALTIERI, 2002).

Para garantir a funcionalidade dos ecossistemas naturais, faz-se necessário que vários processos estejam ocorrendo, como a ciclagem de nutrientes, cobertura do solo, sequestro de carbono, dinâmica da água, sobrevivência dos inimigos naturais de pragas e doenças, dentre outros, e isso só é possível quando há implantação da biodiversidade funcional, que leva aos serviços ecossistêmicos que garantem alimento, abrigo, solos mais férteis, valor cultural, clima, água, atingindo direta ou indiretamente a economia e o bem estar humano (DIAZ et al., 2007). Dentre as diversas espécies que são empregadas nesses sistemas para o manejo dessas produções, as plantas medicinais são bastante abundantes (ALTIERI; NICHOLS, 1999).

Neste contexto, contar com espécies medicinais e aromáticas nos desenhos dos agroecossistemas podem ser de grande valia.

As plantas medicinais podem atuar repelindo ou atraindo insetos, contribuindo com a polinização das plantas, e até mesmo inibindo ou promovendo o desenvolvimento de outras espécies. Quando utilizadas em forma de extratos, podem atuar como fungicidas, inseticidas, herbicidas. Em formas de compostos orgânicos, são fonte de adubações (BORSATO; FEIDEN, 2011; SOUZA et al., 2003).

Quando cultivadas em associação ou intercaladas com outras culturas promovem os processos de melhoria no ambiente. Dentre a diversidade de plantas medicinais, a espécie *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown pode desempenhar papel funcional quando inseridas em sistema de cultivo.

CARACTERIZAÇÃO BOTÂNICA E ASPECTOS AGRONÔMICOS DA *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown

A família Verbanaceae compreende cerca de 175 gêneros e 2800 espécies distribuídas mundialmente. *Lippia* é o quarto maior gênero com aproximadamente 120 espécies, sendo abundante nas regiões do cerrado e caatinga, com destaque para a Chapada Diamantina-Bahia e Espinhaço-MG com alta diversidade desse gênero (FLORA DO BRASIL, 2020). Originária da América do Sul é amplamente distribuída em todo o Brasil (MARTINS et al., 1995), com cultivos na América Central, Flórida e oeste da Índia (TUCKER; MACIARELLO, 1999; PASCUAL et al., 2001).

A *L. alba* é conhecida popularmente como erva cidreira, tabuleiro, alecrim selvagem, cidreira brava, alecrim do campo, salva, salva limão, cidrila e falsa melissa, no entanto, é bastante utilizada como a verdadeira erva cidreira que é a *Melissa officinalis* (ALFAIATE, 2017; JULIÃO et al., 2001; LORENZI; MATOS, 2002). As plantas de *L. alba* são utilizadas na medicina popular no tratamento de resfriados, dores em geral, bronquite, tosse. Podem ser administradas via oral ou em forma de emplastro, as partes mais utilizadas são as folhas ou flores em forma de chás, compressas e banho. Amplamente distribuída em todo território brasileiro, principalmente em regiões tropicais até temperados, são encontradas em solos arenosos, açudes, margens de rios, lagos e lagoas (CORREA, 1992; STEFANINI et al., 2002).

A espécie *L. alba* (Mill.) N. E. Brown destaca-se por ser bastante vistosa no período de floração e pelo aroma que é disperso no ar, é um arbusto aromático que pode medir até 2 metros de altura (SALIMENA, 2000), apresentando ramos finos e esbranquiçados, arqueados e quebradiços e quando se encostam ao solo enraízam,

formando novas plantas, ficando dispostas em touceiras, devido ao seu hábito decumbente. Possuem folhas opostas ou verticiladas, simples ou compostas, elípticas com larguras variadas, sem estípulas, margem serreada ou crenadas e ápice pontiagudo (MELO, 2010; CASTRO et al., 2002; MATOS, 1998). Suas flores são reunidas em inflorescência capituliformes de eixo curto, podendo florescer o ano todo, com fruto drupáceo ou esquizocárpico (CORRÊA, 1992).

É uma planta alógama e com alto vigor. Possui aspecto agrônômico favorável pela sua rusticidade, capacidade se adaptar a variados ambientes, mesmo em solos com baixo teor de nutrientes e pouca disponibilidade hídrica, além da facilidade de se multiplicar via propagação vegetativa (YAMAMOTO, 2006; BRADSHAW, 1965). Essa propagação na maioria das vezes ocorre pelo método da estaquia.

No estudo realizado por Biasi e Costa (2003) demonstrou que os tipos de estacas afetam no desenvolvimento das raízes, sendo recomendadas as que apresentam pelo menos um par de folhas, uma vez que estas continuam o processo fotossintético, disponibilizando carboidratos, hormônios, além de outras substâncias que estimulam o crescimento das raízes adventícias (HARTMANN et al., 2011), em outro estudo foi possível observar que não é necessário o uso do ácido indolbutírico, e que a depender da espécie de *Lippia*, existe a influência da parte de onde é retirada da planta matriz, seja da parte apical ou mediana. (BISPO, 2015).

São os bioativos presentes nessa planta que conferem a ela a propriedade medicinal e aromática, resultante do metabolismo secundário e a sua adaptação ao ambiente, variando tanto na qualidade como na quantidade devido aos fatores abiótico e bióticos (PAULUS et al. 2013; MORAIS, 2009; GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

É possível observar uma vasta variedade de acessos de *Lippia alba*, devido a diversidade fitoquímica, principalmente na classe dos terpeno (GILBERT et al., 2005). Alguns autores relatam em suas pesquisas a caracterização química dos diferentes acessos encontrados em vários lugares (SIANI, 2002; SANTOS-MENDES, 2000). Essa diversificação é resultante da interação do genótipo da planta com o ambiente (JANNUZZI et al., 2011). Os quimiotipos mais abundantes são o citral, citral-mirceno, citral-limoneno, carvona-limoneno, linalol.

CARVALHO (2017) estudando o perfil morfoagrônômico e o rendimento do óleo essencial de dois acessos de *Lippia alba* cultivados no município de Cruz das Almas-Bahia, identificou várias diferenças entre os acessos nas características fenotípicas da planta e nos constituintes majoritários do óleo essencial, demonstrando que o acesso

L001 possui mecanismos que se adaptam melhor a condições ambientais com temperaturas elevadas.

METABOLISMO SECUNDÁRIO E ÓLEOS ESSENCIAIS

Os princípios ativos resultante do metabolismo secundário dos vegetais desenvolvem funções ecológicas, garantindo a sobrevivência da planta em locais adversos decorrentes de estresse (ROCKENBACH, 2018). As principais classes são os terpenos, compostos fenólicos, glicosídeos e alcalóides. Os terpenos compreendem um grande número de compostos com cerca de 40.000 moléculas diferentes e na maioria das vezes são insolúveis em água pela sua baixa densidade a exemplo dos óleos essenciais que podem atuar em diferentes segmentos industriais (GARCÍA; CARRIL, 2009)

Os óleos essenciais são misturas complexas resultantes do metabolismo secundário, podendo conter mais de 100 substâncias e podem ser encontrados em diferentes órgãos das plantas, a exemplo dos tricomas glandulares, canais secretores e cavidades (TEIXEIRA et al., 2013; BIZZO et al., 2009; BAKKALI et al., 2007). São caracterizados como odoríferos, lipofílicos, podem ser vistos de variadas cores, são insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos (MORAIS, 2009; SIMÕES; SPITZER, 2000). São constituídos predominantemente por duas classes de compostos, os terpenos que são mais excessivos e estão presentes em quase todas as plantas, e os fenilpropanóides, que quando estão presentes contribuem com o aroma e sabor (LOBO; LORENÇO, 2007). Os terpenos mais frequentes são os monoterpenos e os sesquiterpenos, com 10 e 15 carbonos respectivamente.

Dentre as variadas classes de grupos os óleos essenciais possuem grande importância por garantir segurança e perpetuação da espécie, graças à sua capacidade de atrair agentes polinizadores e dispersores de sementes, além de atuar como fitoprotetores devido a sua influência nas interações ecológicas existentes (SIMÕES; SPITZER, 2000; BUCHANAN et al., 2000; BRUNETON, 1991). Há registros que indicam que os óleos essenciais também podem atuar como antifúngico, antibacteriano, inseticida e, com efeito, alelopático sob a germinação de sementes e no déficit hídrico (NEGRINI et al., 2019; ALMEIDA et al., 2019; POMBO et al., 2018).

Segundo HOLOPAINEN (2004), os compostos voláteis produzidos pelas plantas são altamente reativos, evitando a oxidação e controlam o efeito da temperatura, umidade e diferentes níveis de irradiação que podem ser nocivas às

plantas. A utilização dos óleos essenciais vem crescendo no decorrer dos tempos, abrangendo diversos segmentos da indústria, como a alimentícia, cosmética, perfumaria, farmacêutica, fitoterápica. Como dito anteriormente, esses apresentam variados potenciais por ter sua origem natural.

O mercado de óleos essenciais movimentava anualmente cerca de US\$ 1,8 bilhão, entretanto o Brasil produz menos 0,1% da sua rica biodiversidade. Entre os óleos que são mais produzidos e exportados estão o de laranja, limão, eucalipto, pau-rosa, lima e capim limão (FERRAZ et al., 2009). Um dos principais constituintes é o limoneno, estando também presente em um dos tipos de *L. alba*, sendo o mais beneficiado e com grande aplicabilidade nos produtos de limpeza e solvente (BIZZO et al., 2009).

Devido as grandes potencialidades que os óleos essenciais possuem e seu valor econômico, conhecer as condições favoráveis que elevem a produção e a qualidade padronizada, é de grande relevância. Além das condições edafoclimáticas, outras práticas de manejo da cultura também podem contribuir.

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais extraídos de um determinado grupo de vegetais exercem papel fundamental na defesa contra vários microrganismos, devido a grande variabilidade e quantidade de compostos bioativos (MAIA et al., 2015). Diante dos impactos que o intenso uso de fungicidas sintéticos pode causar ao ambiente ou acarretar resistência do microrganismo, a utilização dos óleos essenciais passou a ser um dos métodos com potencial no controle de doenças de plantas (TICO et al., 2019).

Existem diversos relatos da eficácia dos compostos químicos que compõem os óleos essenciais, inibindo a atividade fúngica. O gênero *Lippia* tem grande importância na flora brasileira, pela sua distribuição cosmopolita e utilização econômica, devido ao seu aspecto medicinal e condimentar (SANTOS et al. 2015; REIS, et al., 2014; MACHADO et al. 2011). Estudos envolvendo os óleos essenciais extraído de plantas do gênero *Lippia*, demonstrou eficiência no controle de diversos agentes patogênicos (COSTA et al., 2017).

O óleo extraído de *Lippia sidoides* foi capaz de inibir o crescimento micelial de *Sclerotium rolfsii* causador da podridão do colo do feijoeiro na concentração de 400 µg.mL⁻¹ (GONÇALVES et al., 2015). França (2019) comparou a eficiência do óleo essencial de *Lippia gracilis* (Schauer) no controle dos fitopatógenos: *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. musae*, *C. fructicola*, *C. asianum*, *Alternaria alternata*, *A.*

brassicicola, *Fusarium solani*, *F. oxysporum* f. sp. cubense e *Lasiodiplodia theobromae* comprovando seu efeito similar ou superior aos fungicidas sintéticos Tiram e Mancozebe®.

Alguns quimiotipos de *Lippia alba* apresentam uma alta concentração de carvona em sua composição, que é capaz de inibir o crescimento micelial dos fungos fitopatogênicos (NERI, et al. 2007). Peixoto e colaboradores (2018) testaram óleos essenciais extraído de diferentes quimiotipos de *Lippia alba* comprovando que os enantiômeros de carvona e citral foram eficientes no controle dos fungos fitopatogênicos *Lasiodiplodia theobromae*, *Fusarium pallidoroseum* e *Fusarium solani* com efeito fungicida mesmo em baixas concentrações.

Em outro estudo foi possível confirmar o efeito fungicida dos óleos essenciais de *L. alba* com destaque para os quimiotipos citral seguido do linalol no controle de *Alternaria solani* e a não ação do quimiotipo da cânfora (TOMAZONI et al. 2016). Vale ressaltar que os óleos essenciais possuem efeito antifúngico devido ao sinergismo dos diferentes componentes bioativos que compõem o óleo essencial, sendo mais promissor, do que quanto utilizado isoladamente (TIAN et al. 2012).

Diante do exposto, é possível perceber a importância das plantas medicinais, dentre elas a *Lippia alba*, e que o aumento na biomassa pode ser interessante pelo possível aumento na produção do óleo essencial, que exerce diversas potencialidade, inclusive no controle de fitopatógenos. Entretanto, há poucos estudos que abordem a relação do fungo *Trichoderma spp.* na produção de biomassa x óleo, sendo importante desenvolver uma pesquisa que poderá gerar retorno satisfatório à sociedade proporcionando uma nova opção de prática agrônômica, sem causar danos ao ambiente e ocasionando em melhorias no aspecto socioeconômico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, A. R. et al., Seleção de isolados de *Trichoderma spp.* na promoção de crescimento de mudas do feijoeiro cv. carioca e controle de *Sclerotinia sclerotiorum*. **Revista Ciência e Natura** - Universidade Federal de Santa Maria, 34(2) - Departamento de Biologia. 47–58, 2013.
- ALEXANDER, M. Introduction to soil microbiology. In. Wiley J & Sons. New York and London; 1961.
- ALFAIATE, M. B. **Crescimento e produção de óleos essenciais de *Lippia alba* em resposta a diferentes intensidades luminosas e competição de plantas daninhas**. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) UENF, 65f, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, 2017.
- ALMEIDA, L. et al., Bioatividade de óleos essenciais na germinação e no vigor em sementes de tomate. **Biotemas**, Florianópolis, v. 32, n. 2, p. 13-21, jun. 2019.
- ALTIERI, M. A.; NICHOLS, C. Agroecologia: teoria y aplicaciones para una agricultura sustentable. Alameda: University California, 1999.
- ALTIERI, M. A. **Agroecología: principios y estrategias para diseñar sistemas agrarios sustentables**. In: SARANDON, S. J. Agroecología: el camino hacia una agricultura sustentable. Buenos Aires – La Plata, 2002.
- BAKKALI, F. et al., Biological effects of essential oil: a review. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, n.2, p.446-75, 2007.
- BENÍTEZ, T. et al., Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, v.7, n.4, p.249-260, 2004.
- BIASI, L. A.; COSTA, G. *Propagação vegetativa de Lippia alba*. **Ciência Rural** [online]. v.33, n.3, p.455-459, 2003
- BISPO L.P. **Propagação, cultivo e produção de óleo essencial de espécies de *Lippia* (verbenaceae) ocorrentes no semiárido baiano**. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) UEFS, 86f, Feira de Santana, Bahia, 2015.
- CARVALHO, D.D.C. et al., Controle de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* *in vitro* e em sementes, e promoção do crescimento inicial do feijoeiro comum por *Trichoderma harzianum*. **Tropical Plant Pathology**, v.36, p.36-42, 2011.
- CARVALHO, T.M. et al. Verification of the antibacterial activity in vitro of essential oils of *Cinnamomum zeylanicum* and *Rosmarinus officinalis* in bacteria which cause infections of the urinary tract. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v.42, n.3, p.213-5, 2010.
- COSTA, P. S., et al. Atividade antimicrobiana e potencial terapêutico do gênero *Lippia* sensu lato (Verbenaceae). **Hoehnea**, v. 44, n. 2, p. 158-171, 2017.

BORSATO, A. V.; FEIDEN, A. Biodiversidade funcional e as plantas medicinais, aromáticas e condimentares. Corumbá: Embrapa Pantanal, 11p, .2011.

BIZZO, H.R. et al., Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v.32, n.3, p. 588-594, 2009.

BRACCINI, M. C. L et al., Avaliação do pH da rizosfera de genótipos de café em resposta à toxidez de alumínio no solo. **Bragantia**, v59, 2000, p.83-88.

BRADSHAW, A.D. Evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants. In Advances in genetics (E.M. Casparly & J.M. Thoday, eds.). **Academic Press**, New York. p.115-155, 1965

BRUNETON, J. Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia. Zaragoza: Editorial Acribia, 1991.

BUCHANAN, B.B. et al., (eds). Biochemistry and molecular Biology of Plants, Rockville: ASPP, 2000.

CARNEIRO, J. G. A. **Produção e controle de qualidade de mudas florestais**. Curitiba: UFPR/FUPEF, p.451, 1995.

CHAGAS, H. S. et al., Homem e o meio biofísico amazônico: Relações do sujeito em seu agroecossistema às margens do rio Meruú-Açu. **Cadernos de Agroecologia**, [S.l.], v. 10, n. 3, may 2016.

CHAGAS, L. F. B. et al., *Trichoderma* na promoção do crescimento vegetal. **Revista de Agricultura Neotropical**, Cassilândia-MS, v. 4, n. 3, p. 97-102, 2017.

CORREA, C.B.V. Anatomical and histochemical study of *Lippia alba*(Mill.) N. E. Br. Ex Britt & Wilson, known as erva-cidreira. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v.73, n.3, p.57-64, 1992.

CASTRO, D.M. et al. Biomass production and chemical composition of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. Ex Britt & Wilson in leaves on different plant parts in different seasons. **Acta Horticulturae**, v.1, n.51, p.569, 2002.

DANTAS, J.S. et al., Interactions among groups of microorganisms with rhizosphere. **Applied Research & Agrotechnology**, v.2, n.2, p.219-224, 2009.

DI STASI, L.C. Plantas Medicinais: verdades e mentiras - o que os usuários e os profissionais da saúde precisam saber. São Paulo: UNESP, 2007.

DIAZ, S. et al., Functional diversity – at the crossroads between ecosystem functioning and environmental filters. In: CANADELL, J. G.; PATAKI, D.; PITELKA, L. (Org.). Terrestrial ecosystems in a changing world. Berlin: Springer-Verlag, p.81-91, 2007.

DRUZHININA, I.; KUBICEK, C. P. Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters? **Journal of Zhejiang University Science B**, v.6, n.2, p.100-112, 2005.

ELAD Y. Biological control of foliar pathogens by means of *Trichoderma harzianum* and potential modes of action. **Crop Prot.** v.19, p.709-714, 2000.

ESPOSITO, E.; SILVA, M. Systematics and environmental application of the genus *Trichoderma*. **Critic Rev Microbiol**, v.24, p.89-98, 1998.

FERON, G. et al., Prospects for the microbial production of food flavours. **Trends in Food Science & Technology**, v.7, p.285-293, 1996.

FERRAZ, J. B. S. et al. Perfumes da floresta Amazônica: em busca de uma alternativa sustentável. **Ciência e Cultura**, v.61, n. 3, p. 45-53, 2009.

FIRÁKOVÁ, S.; ŠTURDÍKOVÁ, M.; MÚCKOVÁ, M. Bioactive secondary metabolites produced by microorganisms associated with plants. **Biologia**, Bratislava, v. 62, p. 251-257, 2007.

Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/> >. Acesso em: 10 de Março de 2019

FORTES, F.O. et al., Promoção de enraizamento de microestacas de um clone de *Eucalyptus* sp. por *Trichoderma* spp. **Rev. Árvore**, v.3, n.2, p.221-228, 2007.

FRANÇA, K. R. S. Potencial fungitóxico do óleo essencial de *Lippia gracilis* (Schauer) in vitro sobre fitopatógenos. 2019. 55 f. **Dissertação (Mestrado Acadêmico em Sistemas Agroindustriais)** - Programa de Pós-Graduação em Sistemas Agroindustriais, Centro de Ciências e Tecnologia Agroalimentar, Universidade Federal de Campina Grande, Pombal, Paraíba, Brasil, 2019.

GARCÍA, A. A.; CARRIL, E. P. Metabolismo Secundario de Plantas. **Reduca** (Biología). Serie Fisiologia Vegetal, v.2, n.3, p.119 -145, 2009.

GILBERT, B.; FERREIRA, J.L.; ALVES, L.F. **Monografias de plantas medicinais brasileiras e aclimatadas.** Curitiba: ABIFITO, 2005. 250p.

GRESSEL J. HARTMANN K.M. Morfogênese in *Trichoderma*: action spectrum of photoinduced sporulation. *Planta* v79, p.271-274, 1968

GOBBO-NETO L.; LOPES, P. N. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**. v.30, n.2, 2007.

GONÇALVES, A.H. et al., Atividade fungitóxica in vitro dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* Cham., *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf. e de seus constituintes majoritários no controle de *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii*. **Revista Brasileira de plantas Mediciniais**, Campinas, v.17, n.4, supl. III, p.1007-1015, 2015.

HARMAN, G.E. et al. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**. v.2, p.43-56, 2004.

HARTMANN, H. T. et al. **Plant propagation: principles and practices.** 8.ed. New Jersey: Prentice Hall, 915 p., 2011.

HOLOPAINEN, J. K. (2004). Multiple functions of inducible plant volatiles. **Trends in Plant Science**. v.9, p. 529-533, 2004.

JANNUZZI, H. **Caracterização de dezesseis acessos de *Lippia alba*(Mill) N.E. Brown, no Distrito Federal**. 2006. 54p. Dissertação (Mestrado - Área de Concentração em Produção Vegetal) - Departamento de Agronomia, Universidade de Brasília, Brasília.

JULIÃO, L.S. et al. **Cromatografia em camada fina dos extratos etanólicos de três quimiotipos de *Lippia alba*(Mill) N.E.Br. (erva cidreira)**. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE FARMACOGNOSIA, 3, 2001, Curitiba: UFPR, 2001. 165p.

KIRK, P INDEX FUNGORUM. CABI Bioscience, CBS and Landcare Resarch, available online, ed. 2012. Disponível em www.indexfungorum.org, Acesso em: 22/05/2018.

LIMA I.O. et al., Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.17, n.2, p.186-190, 2007.

LIMA, N.P. Estaquia semilenhosa e comparação de metabólitos secundários em *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schultz Bip ex Baker. 2001. 85f. **Dissertação (Mestrado em Agronomia)** Curso de Pós-graduação em Agronomia, UFPR.

LOBO, A.M., LOURENÇO, A.M. (eds). **Biossíntese de produtos naturais**. Lisboa: IST Press, 272, 2007

LORENZI, H. MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas**, Nova Odesa: Plantarum, p.544, 2002.

MACHADO, T.F. et al., **Aplicação de Antimicrobianos Naturais na Conservação de Alimentos**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, p. 21-27, 2011

MACHADO, D. F. et al., *Trichoderma* no Brasil: O Fungo e Bioagente. **Revista de Ciências Agrárias**, Lisboa, v. 35, n. 1, p. 274-288, 2012.

MACHADO, D. F. M. et al., *Trichoderma spp.* na emergência e crescimento de mudas de cambará (*Gochnatia polymorpha* (Less.) Cabrera). **Revista Árvore**, Viçosa, v.39, n.1, p.167-176, 2015.

MARTINS, E.R. et al. **Plantas medicinais**. Viçosa: UFV, p.220, 1995.

MATOS, F.J.A. Descrição das plantas medicinais. In: **Farmácias vivas**. 3.ed. Fortaleza: Edições Universidade Federal do Ceará, p.107-8, 1998.

MELO, I. S. Potencialidades de utilização de *Trichoderma spp.* no controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIAL, W. Controle biológico de doenças de plantas. Jaguariúma: CNPDA/EMBRAPA (EMBRAPA-CNPDA Boletim de Pesquisa,15), 1991.

MELO, J. I. M. et al. Verbenaceae sensu lato em um trecho da ESEC Raso da Catarina, Bahia, Brasil. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 23, n. 3, 2010, p. 41-47.

MORAIS, L. A. S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 27, n. 2, p. S3299-S3302, 2009.

NACHTIGAL, G.F. Espécies de *Trichoderma*: fungos benéficos a serem favorecidos por práticas adequadas de manejo. 2012. Artigo em Hypertexto. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2012_1/Trichoderma/index.htm> Acesso em: 12/6/2018.

NEGRINI, M. et al. Atividade inseticida de óleos essenciais para o controle da lagarta-do-cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda*. **Arquivo Instituto Biológico**. vol.86, e1112018, 2019.

NERI, F. et al., Fungicidal activity of plant volatile compounds for controlling *Monilinia laxa* in stone fruit. **Plant Disease**. Saint Paul, pp. 30-35, 2007.

ODUM, E. P.; BARRETT, G. W. **Fundamentos de ecologia**. São Paulo: Cengage Learning, 2008. 612p.

PASCUAL, M.E. et al. Antiulcerogenic activity of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown (Verbenaceae). **II Farmaco**, v.56, p.501-4, 2001.

PAULUS D. et al., Teor e composição química de óleo essencial de cidrô em função da sazonalidade e horário de colheita. **Horticultura Brasileira** v.31, p.203-209, 2013.

PEIXOTO, MG et al., Atividade de óleos essenciais de quimiotipos de *Lippia albae* seus principais monoterpenos contra fungos fitopatogênicos. **Bioscience Journal** , v34, n5, 2018.

POMBO, J. C. P. et al., Efeito antimicrobiano e sinérgico de óleos essenciais sobre bactérias contaminantes de alimentos. **Segurança Alimentar E Nutricional**, v25, n.2, p.108-117, 2018.

POMELLA, A.W.V.; RIBEIRO, R.T.S. Controle biológico com *Trichoderma* em grandes culturas - uma visão empresarial. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. (Ed.). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. p.239-244, 2009

REIS, A. C., et al. *Lippia alba*(Verbenaceae): A New Tropical Autopolyploid Complex. **American Journal of Botany**, p. 1002-1012, 2014.

ROCKENBACH, A.P. et al. Interferência entre plantas daninhas e a cultura: alterações no metabolismo secundário. **Revista Brasileira de Herbicidas**, [S.l.], v. 17, n. 1, p. 59-70, mar. 2018. ISSN 2236-1065.

RUEGGER, J. S.; TAUKE-TORNISIELO, S. M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira Botânica**, v. 27, n. 2, p. 205-211, 2004.

- SALIMENA, F. R. G. **Revisão taxonômica de Lippia sect. Rhodolippia Schauer (Verbenaceae)**. 2000. 1v. 562f. Tese (Doutorado em Botânica) - USP, São Paulo, São Paulo.
- SAMUELS, G. J.; DODD, S. L.; LU, B. S.; PETRINI, O.; SCHROERS, H. J.; DRUZHININA, I. S. The *Trichoderma koningii* aggregate species. **Stud Mycol**, v. 56, p. 67-133, 2006.
- SANTOS, A. et al., Uso popular de espécies medicinais da família Verbenaceae no Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, pp. 980-991. 2015
- SANTOS-MENDES, M.M.F.B. et al., Caracterização fitoquímica do óleo essencial de 8 formas de *Lippia alba*, cultivadas em São Manuel - SP. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 16., 2000, Recife. **Resumos...** Recife: UFPE, 2000. p.73.
- SIANI, A.C. et al. Linalool from *Lippia alba*: study of the reproducibility of the essential oil profile and the enantiomeric purity. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.50, p.3518-21, 2002.
- SILVA, V. N. et al., Promoção de crescimento e indução de resistência à antracnose por *Trichoderma spp.* em pepineiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília-DF, v. 46, n. 12, p. 1609-1618, 2011.
- SILVA JUNIOR, A.A. Plantas medicinais. Itajaí: **EPAGRI**, 1998. CD-Rom.
- SIMÕES C.M.O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C.M.O. et al, Farmacognosia da planta ao medicamento. Porto Alegre/ Florianópolis: **Editora da UFRGS/Editora da UFSC**, 2000. P.387-416
- SIVASITHAMPARAM, K., GHISALBERTI, E.L., 1998. Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. In: Harman, G.E., Kubicek, C.P. (Eds.), *Trichoderma and Gliocladium*, vol. 1. **Taylor & Francis**, London, UK, pp. 139–191.
- STEFANINI, M. B. et al., Ação de fitorreguladores no crescimento da erva-cidreira brasileira. **Horticultura Brasileira**, v.20, n.1, p.18-23, 2002.
- STROBEL G.A. Endophytes as Sources of Bioactive Products. **Microbes and Infection**, v.5, p.535–544, 2003.
- SOUZA, O.V.S. et al. Estudo farmacognóstico de galhos de *Vanillosmopsis erythropappa* Schult. Bip. – Asteraceaea. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.13, p.50-53, 2003.
- SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological Research**, v.109, p.661-686, 2005.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918p.

TEIXEIRA, B. et al., Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. **Industrial Crops and Products**, v.43, 587-595, 2013

TEIXEIRA, V.M. Manejo da agrobiodiversidade funcional na agricultura familiar: princípios e estratégias para o desenho de agroecossistemas sustentáveis. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v.2, n.2, p. 710-713, 2007.

TIAN J. et al., O mecanismo de ação antifúngica do óleo essencial de endro (*Anethum graveolens* L.) sobre *Aspergillus flavus*. **PLoS ONE** v.7 n.1, e30147 2012.

TICO B. M. et al., Óleos essenciais no controle do *Fusarium* sp. da cana de açúcar *in vitro*. **Revista Brasileira de Meio Ambiente** v. 7, n. 3, 2019.

TOMAZONI, E. Z. et al. Atividade antifúngica in vitro de quatro quimiotipos de óleos essenciais de *Lippia alba*(Verbenaceae) contra isolados de *Alternaria solani* (Pleosporaceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 88, n. 2, p. 999-1010, 2016.

TUCKER, A. O.; MACIARELLO. M. J. Volatile oil of the “licorice verbena” [*Lippia alba*(Mill.) N. E. Brown ex Britton and P. Wils. var. *carterae* Moldenke] from the North American herb trade. **Journal of Essential Oil Research** v.11 p.314-316, 1999.

VEIGA V.F.J; PINTO A.C; MACIEL M.A; Plantas medicinais: cura segura? **Quím. Nova [online]**., vol.28, n.3, pp.519-528, 2005.

YAMAMOTO, P. **Interação Genótipo X ambiente na produção e composição de óleos essenciais de *Lippia alba*(Mill.) N.E. Brown**. 2006. Tese (Doutorado), Universidade de Campinas, Campinas, 2006.

YEDIDIA, I. et al., Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 235, n. 2, p. 235- 242, Aug. 2001.

ARTIGO 1

**BIOMASSA E TEOR DE ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown
COM INOCULAÇÃO DE *Trichoderma spp.* CULTIVADAS EM CASA DE
VEGETAÇÃO E CAMPO**

VANESSA FERREIRA DE JESUS

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA
SETEMBRO DE 2020**

**BIOMASSA E TEOR DE ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown
COM INOCULAÇÃO DE *Trichoderma* spp. CULTIVADAS EM CASA DE
VEGETAÇÃO E CAMPO**

Resumo: Este trabalho foi conduzido com o objetivo de avaliar o efeito da aplicação de *Trichoderma* na produção de biomassa, teor e composição química do óleo essencial de *Lippia alba*. Dois experimentos foram realizados, um em casa de vegetação a fim de avaliar a produção de mudas, e outro para avaliar a produtividade das plantas cultivadas no campo. Para a propagação das mudas estacas foram coletadas de plantas matrizes situadas no campo experimental do CCAAB da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, após o enraizamento em tubetes contendo uma mistura solo, substrato comercial e húmus, as plantas foram transplantadas para sacos de polietileno contendo o mesmo substrato mais o tratamento. O delineamento experimental foi o de blocos ao acaso, sendo 3 isolados de *Trichoderma* e o controle, com 4 blocos, cada parcela experimental era composta por 10 mudas, totalizando 160. Quinzenalmente era feita a inoculação da suspensão de esporos sendo 10 mL numa concentração de 10^7 conídios/mL dos isolados de *Trichoderma* na base da planta, até 75 após o transplante, totalizando 5 inoculações, onde foi realizada a coleta de dados. Para o cultivo das plantas em campo, as mudas foram propagadas como citado acima, onde foi realizado o pré-tratamento, após 30 dias de incubação após o transplante, as mudas foram levadas para o campo, e plantadas em canteiros com aproximadamente 15m^2 , no espaçamento $1\text{m} \times 0,5\text{m}$, e mantidas sob sombrite e com irrigações manuais até a sua estabilização, o delineamento seguiu o do experimento 1, porém com 6 plantas por unidade experimental, totalizando 96 plantas. As aplicações do *Trichoderma* seguiu a do experimento acima, porém numa concentração de 10^8 conídios/mL, realizado no período da manhã na base das plantas, até 150 dias após o plantio no campo. A coleta de dados de ambos os experimentos foram realizados avaliando características fitotécnicas e realização da extração do óleo essencial das mudas de *Lippia alba* frescas e secas, e das plantas em campo a extração do óleo foi realizado das folhas secas. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey com o auxílio do programa R® versão 3.6.1. Pelos resultados obtidos, foi possível observar que os isolados de *Trichoderma* promoveu o incremento na massa fresca das folhas, porém foi superior nas plantas do controle, para massa

seca do caule houve incremento de carbono nas mudas que foram tratadas com os isolados TCS85 seguido do TCS 29. Os isolados de *Trichoderma* fizeram com que a planta se adaptasse ao ambiente, reduzindo o teor do óleo essencial. O processo de secagem reduz significativamente a quantidade de óleo essencial presente nas folhas das mudas de *Lippia alba*. No cultivo em campo, foi possível validar que os isolados de *Trichoderma* produziu um maior número de hastes, conseqüentemente maior número de folhas, e a aplicação do isolado TCS29 foi o mais estimulou a produção de raízes.

Palavras-chave: Interação Planta – Microrganismo, erva cidreira, Promotor de Crescimento Vegetal, Agricultura orgânica

INTRODUÇÃO

De modo geral, as espécies medicinais possuem variados princípios ativos, que visa sua adaptação ao meio onde estão inseridas e desempenham papel funcional em diversos agroecossistemas produtivos ou são importantes a novos desenhos.

Dentre os princípios ativos existentes, a *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown se destaca pela produção de óleo essencial, que possui diferentes potenciais comprovados cientificamente, como: antibacteriano, antifúngico e alelopático (NEGRINI et al., 2019; BANDEIRA JUNIOR et al., 2019; ALMEIDA et al., 2019; POMBO et al., 2018; GUIMARÃES et al., 2017; HIRATA et al., 2018). Devido a essas potencialidades, diferentes segmentos industriais demonstram interesse pelo óleo essencial, ocasionando geração de emprego e renda para os produtores.

A *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown pertence à família Verbenaceae, muito frequente no semiárido brasileiro, podendo ocorrer em outras áreas devido a sua plasticidade fenotípica. É conhecida popularmente por erva cidreira de arbusto, e utilizada em várias preparações, tais como: chás, compressas e outros, por possuir atividade analgésica e espasmolítica.

Os princípios ativos são elaborados por meio de rotas metabólicas, resultantes do metabolismo secundário, que produzem compostos orgânicos e não exercem influência direta sob o desenvolvimento e crescimento vegetal. (SIMÕES et al., 2010).

A quantidade e qualidade dos óleos essenciais é resultado da influência das condições edafoclimáticas, como: temperatura, umidade, pluviosidade, genética, nutrientes do solo, dentre outros, que as plantas são submetidas, entretanto, conhecer a cadeia produtiva dessas plantas é de fundamental importância, devido a essas circunstâncias (GOBBO-NETO; LOPES, 2007; MORAIS, 2009; PAULUS et al., 2013).

O desenvolvimento de agroecossistemas com manejo auto regulável tem se tornado alvo de estudos completos e multidisciplinares que envolvem as interações entre os diferentes níveis tróficos de um ecossistema. Dentre os diferentes segmentos enfatizados na pesquisa com plantas medicinais, estudar o cultivo e as diferentes formas de manejo, a fim de potencializar a produção de biomassa e metabólitos secundários, tem sido de extrema importância.

A inserção de microrganismos gera aspectos positivos ao ambiente pelas propriedades que ambos exercem no meio, tais como liberação de exsudatos orgânicos, melhorando nas características físico-químicas do solo, dentre outros.

Um manejo sustentável que vem sendo muito estudado é a inserção de microrganismos como, o *Trichoderma spp*, que interage com as plantas devido aos seus mecanismos de ação, podendo estimular o seu crescimento e desenvolvimento. Entretanto, estudos com o fungo *Trichoderma* relacionados ao crescimento vegetal de plantas medicinais têm sido escassos (POMELLA E RIBEIRO, 2009). Visto a necessidade de compreender a ação do *Trichoderma* na produção de biomassa da *Lippia alba*, nesse estudo objetivou-se analisar a influência de isolados de *Trichoderma spp*. na biomassa e no teor do óleo essencial de plantas de *L. alba* cultivadas em casa de vegetação e em campo.

MATERIAL E MÉTODOS

Localização do experimento

O experimento foi conduzido em casa de vegetação e no campo experimental, ambos situados no Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), em Cruz das Almas-Bahia, localizado geograficamente a 12°39'31.7"S 39°05'07.6"W e 12°39'26.5"S 39°04'55.8"W respectivamente, com altitude de 220m. Entre os meses de Outubro/2018 e Janeiro/2019 foi feito o cultivo das plantas em casa de vegetação, identificando baixo índice de pluviosidade e entre os meses Março e agosto/2019 o cultivo das plantas no campo, sendo o clima classificado como sub-úmido, os dados climáticos do período experimental são apresentados na FIGURA 1, para as demais atividades foi utilizado os Laboratórios de Fitoquímica e Microbiologia.

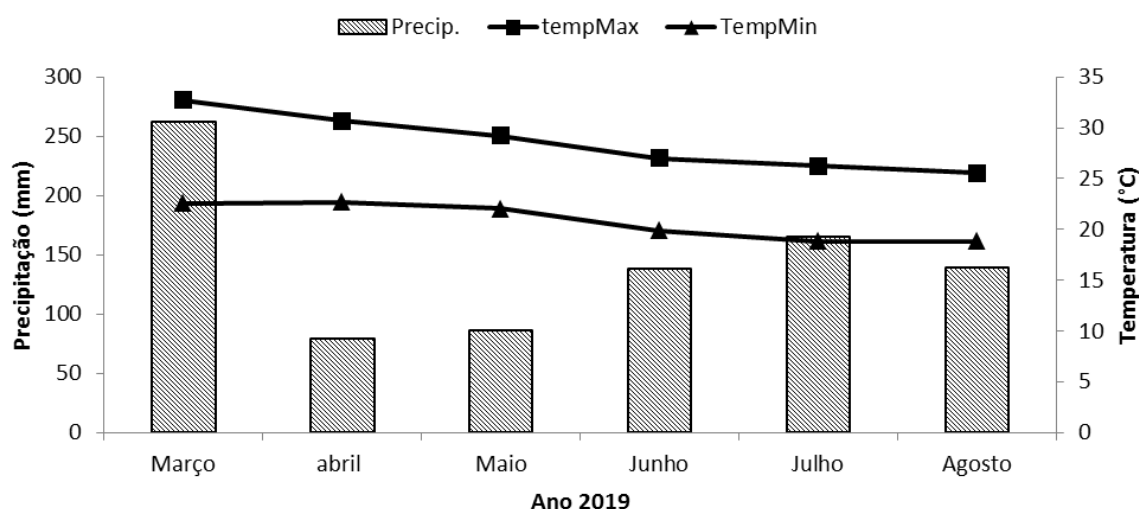


FIGURA 1: Dados de precipitação, temperatura máxima e mínima. Médias entre Março e Agosto de 2019 em Cruz das Almas (Dados fornecido pela Embrapa Mandioca e Fruticultura – Cruz das Almas-BA).

Propagação e plantio das mudas

As matrizes utilizadas para propagação assexuada das mudas de *L. alba* são cultivadas no campo experimental da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, campus de Cruz das Almas-Bahia, identificadas como acesso L001, com quimiotipos abundantes de Carvona, Limoneno e germacreno D (CARVALHO, 2017). As estacas foram adquiridas de ramos na região mediana das plantas com aproximadamente 20 cm de comprimento, 0,5cm de diâmetro e um par de folhas (reduzidos a metade, para reduzir a perda de água) foram colocadas para enraizar em tubetes 50 cm³ preenchidos com substrato contendo uma mistura de solo: substrato comercial Vivatto®: húmus) na proporção 3:3:1. Após 21 dias do enraizamento das estacas, foram transplantadas para sacos de polietileno com capacidade para 2L, contendo o mesmo substrato.

2.2 Obtenção dos isolados de *Trichoderma*

Os isolados de *Trichoderma* foram obtidos da coleção de microrganismos do Laboratório de Microbiologia da UFRB, com identificação morfológica e molecular (MASCARENHAS, 2016). Os isolados TCS 87 (*Trichoderma asperellum*) e TCS 85 (*Trichoderma asperellum*) foram obtidos de plantas de bananeira em área de produção do município de Bom Jesus da Lapa, Bahia, Brasil (13° 15' 18" S e 43° 25' 05" W). O isolado TCS 29 (*Trichoderma harzianum*) foi obtido de solo de área de plantio de sisal da região sisaleira no município de Campo Formoso-BA

2.3. Obtenção da suspensão de esporos

Discos de micélios das culturas com aproximadamente 5 mm de diâmetro, foram transferidos para o centro da placa de Petri contendo meio de cultura BDA 1/5 (Batata-Dextrose-Ágar com os nutrientes diluídos para 1/5), e posteriormente, acondicionado em B.O.D. com temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas durante 7 dias. Após o período de incubação foram adicionadas à placa de Petri água destilada esterilizada e uma gota de Tween 20® com o objetivo de suspender os propágulos fúngico. Os conídios foram suspensos, após a raspagem da colônia com auxílio da alça de Drigalsky esterilizada com posterior contagem de esporos em câmara de Neubauer para ajuste da suspensão na concentração. (LEANDRO et al., 2007).

2.4. Plantio e inoculação dos isolados de *Trichoderma spp.*

As mudas de *L. alba* foram cultivadas em sacos com capacidade de 2 kg contendo preenchidos com substrato comercial, solo e húmus na proporção 3:3:1, sendo aplicado quinzenalmente 10 mL da suspensão de esporos numa concentração de 10^7 esporos/mL, totalizando 5 aplicações. O solo foi coletado de uma área de pastagem, numa profundidade de 0-20, classificado como Latossolo Amarelo Distrocoeso. O substrato comercial é composto por casca de pinus bioestabilizada e vermiculita.

Após a propagação das mudas em casa de vegetação, e incubação por 30 dias, submetidas a 2 inoculações de 10mL numa concentração de 10^7 esporos/mL em intervalo de 15 dias, as plantas foram transplantadas para o campo em canteiros com aproximadamente 15 m², o espaçamento do plantio foi de 1m entre plantas e 0,5m entre linhas, não sendo realizado nenhum tipo de adubação nos canteiros. Após o plantio foi instalado um sombrite sob as plantas, a fim de reduzir à incidência dos raios solares e consequentemente a estabilidade das plantas as novas condições climáticas, com irrigações diárias. Após 15 dias do plantio, foram retomadas as aplicações dos tratamentos quinzenalmente sendo 10 mL numa concentração de 10^8 esporos/mL (LEANDRO, et al., 2007), por plantas se estendendo até o final do experimento, aos 150 dias.

2.5. Avaliação dos parâmetros de crescimento

Com o objetivo de observar a influência dos diferentes isolados de *Trichoderma spp.* no desenvolvimento da *L. alba*, foi avaliado o diâmetro inicial e final das plantas cultivadas em casa de vegetação. A massa fresca das partes aéreas das plantas (folhas, caule e botão floral (apenas para as cultivadas em campo) e a massa seca radicular foi determinado com auxílio de balança semi-analítica (g) após secagem em estufa com ventilação forçada a $65\pm 2^\circ\text{C}$ até massa constante

Para a determinação da massa seca das diferentes partes que compõem a parte aérea, foi utilizada a fórmula descrita por MATTOS (2000), onde: Massa seca = [Massa verde – (Massa verde x teor de umidade)]. O teor de umidade foi determinado através da equação: [(Peso inicial - Peso final) / Peso Inicial] x 100.

Amostra do material vegetal fresco foi separada para determinar o teor de umidade, o procedimento foi realizado em triplicata, contendo 3g do material vegetal de folhas. As amostras foram secas a uma temperatura de 65°C , até massa constante.

2.6. Extração do óleo essencial

A extração do óleo essencial foi realizada pelo método da hidrodestilação conforme metodologia descrita por TELES (2010), no laboratório de fitoquímica do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da UFRB. A exsicata utilizada na identificação da espécie encontra-se depositada no Herbário da UFRB, sob o número de registro HURB 8794.

A extração do óleo essencial foi realizada em duas etapas para as plantas cultivadas em casa de vegetação, sendo: a das folhas frescas e a outra plantas secas, que foram submetidas a secagem em estufas de circulação forçada a 45°C, até massa constante. As folhas foram colocadas no balão volumétrico com capacidade para 2.000 ml onde posteriormente adicionou-se água destilada até que o material vegetal fosse coberto. O balão foi acoplado em equipamento Clevenger aquecido com o auxílio da manta térmica (Figura 2). O processo durou 150 minutos após a condensação da primeira gota. Para as plantas cultivadas em campo, o processo foi realizado com as folhas após o processo de secagem como descrito acima.



FIGURA 2. Equipamento Clevenger utilizado para hidrodestilação do óleo essencial.

O óleo extraído das folhas de *L. alba* foi retirado do aparelho com o uso da pipeta do tipo Pasteur, e pesado em balança analítica de alta precisão para determinação do teor do óleo essencial (%) massa/massa (g de óleo a cada 100g de massa fresca). O óleo foi armazenado em frascos de vidro com capacidade para 2 mL, identificados e armazenados sob refrigeração e ao abrigo da luz. A determinação do teor do óleo essencial (%) foi calculada a partir da Base Livre de Umidade (BLU),

pois é um método padronizado e pode ser repetido sem que haja desvios significativos (SANTOS et al., 2004). Foi utilizada a equação:

$$T_o = \frac{V_o}{\frac{B_m - (B_m \times U)}{100}} \times 100$$

T_o = Teor do óleo essencial

V_o = Volume/peso do óleo extraído

B_m = Biomassa vegetal

U (%) = Umidade

$(B_m \times U) / 100$ = Quantidade de umidade ou água presente na biomassa

$\{B_m - [(B_m \times U)/100]\}$ = Quantidade de biomassa seca, isenta de água ou livre da umidade

2.7. Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento utilizado para ambos experimentos foi o de blocos ao acaso com 4 tratamentos (T_0 – Controle; T_1 - TCS29; T_2 - TCS87 e T_3 - TCS85) e 4 blocos. Para o experimento conduzido em casa de vegetação, a parcela experimental constituída de 10 plantas, totalizando 16 parcelas e 160 plantas de *L. alba*. Para o experimento conduzido em campo experimental, cada canteiro se constituiu de um bloco, com 6 plantas por parcela experimental, totalizando 24 plantas por bloco e 96 plantas ao todo (Figura 3).

As médias das variáveis agrônômicas foram submetidas à análise de variância, normalidade dos dados e posteriormente o teste de Tukey para determinação do melhor isolado para os parâmetros avaliados. Utilizou-se o programa R[®] versão 3.3.4, pacote ExpDes.pt.

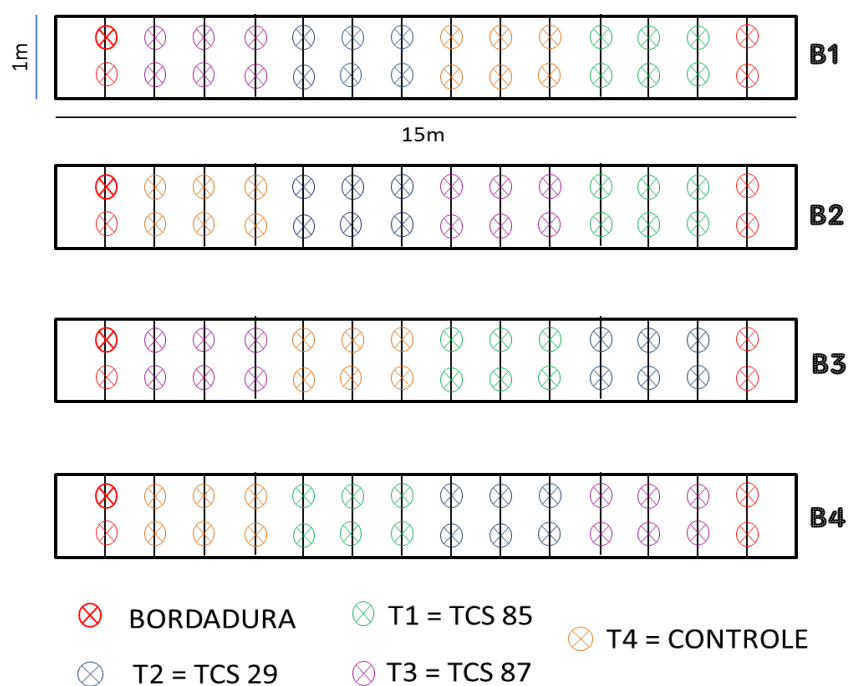


FIGURA 3: Esquema experimental.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para produção de mudas de *Lippia alba* em casa de vegetação, foi insignificante a variação no diâmetro do caule, quando avaliado após 75 dias do transplante, nos tratamentos controle, TCS87 e TCS29, a variação máxima foi de 70mm, entretanto, as mudas submetidas ao tratamento com o isolado TCS85 permaneceram com a mesma espessura quando comparado o valor inicial com o final (FIGURA 4).

O mesmo resultado foi encontrado por Mendonça e Silva (2019) onde a aplicação do *Trichoderma* não obteve efeito significativo no diâmetro do coleto das mudas de diferentes genótipos de pimenteira-do-reino. Diferente dos resultados encontrados por Amaral et al., (2017) que relatou o aumento significativo do diâmetro de mudas de carobas (*Jacaranda micrantra*) quando o substrato foi inoculado com *Trichoderma*.

O diâmetro do coleto é uma variável importante, pois quanto maior, passam a ter equilíbrio para o crescimento da parte aérea, além de ser a mais utilizada para indicar a capacidade das mudas em campo (CARNEIRO, 1995; DANIEL et al., 1997). O diâmetro das estacas coletadas pode ter influenciado nesse resultado, pois estacas com 1 à 1,2 cm são mais eficientes na propagação de mudas dessa espécie (MARCHESE et al., 2010)

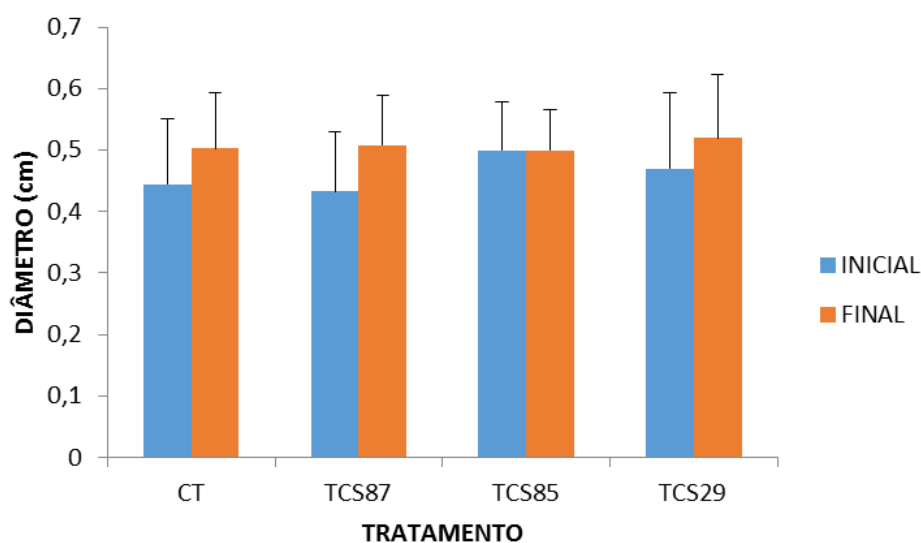


FIGURA 4. Diâmetro inicial e final de mudas de *Lippia alba* cultivadas em casa de vegetação sob ações sucessivas de diferentes isolados de *Trichoderma spp.*

Analisando-se a tabela 1 com as características fitotécnicas em função dos tratamentos, observamos diferenças significativas para as variáveis: massa fresca das folhas (MSF), massa seca do caule (MSC), massa seca total da parte aérea (MSTPA) e massa seca total (MST) das mudas de *Lippia alba*. A MFF foi superior nas mudas que não receberam a aplicação do fungo, não diferindo das mudas tratadas com os isolados TCS87 e TCS85, diferindo apenas do tratamento com o isolado TCS29. Segundo AZARMI et al (2011) Alguns isolados de *Trichoderma* podem reduzir a biomassa vegetal e a atividade microbiana.

A MSC nas mudas tratadas com os isolados TCS85 foi superior, não diferindo do isolado TCS29. É possível notar que houve incorporação de carbono e que essa estimulação é excelente na formação da copa da planta. Esse mesmo comportamento foi evidenciado no estudo de BROETTO (2013) onde demonstra que os isolados de *Trichoderma* foram capazes de incrementar a massa seca da haste do feijoeiro após o tratamento das sementes com suspensão de *Trichoderma*.

A MSTPA e MST das mudas de *L. alba* foram superiores quando submetidas a inoculação com o isolado TCS85, seguido do isolado TCS29 e controle, diferindo das mudas tratadas com o isolado TCS87.

Tabela 1. Produção de biomassa da de plantas de *Lippia alba* cultivadas em casa de vegetação com aplicação de diferentes isolados de *Trichoderma spp.* MFF= Massa Fresca das Folhas; MFC= Massa Fresca do Caule; MFTPA: Massa Fresca Total da Parte Aérea; MSF: Massa Seca das Folhas; MSC: Massa Seca do Caule; MSR: Massa Seca da Raiz; MST: Massa seca total

TRATAMENTO	MFF*	MFC ^{ns}	MFTPA ^{ns}	MSF ^{ns}	MSC*	MSTPA*	MSR ^{ns}	MST*
	Gramas							
TCS29	3,65 b	5,12	8,7 a	0,89 a	2,17 ab	3,07 ab	2,46	5,53 ab
TCS87	3,95 ab	4,97	8,91 a	0,92 a	1,77 c	2,69 b	2,38	5,07 b
TCS85	4,09 ab	5,3	9,40 a	1,05 a	2,47 a	3,52 a	2,65	6,18 a
CONTROLE	4,49 a	5,22	9,71 a	1,04 a	1,99 bc	3,04 ab	2,62	5,66 ab
Média	4,045	5,15	9,19	0,98	2,100	3,08	2,53	5,61
CV(%)	32,13	29,99	27,55	32,17	30,36	27,57	31,78	24,93

^{ns}, *, ** = Não significativo, e significativo à 1% e 5%, respectivamente.

São os diversos fatores que podem ter acarretado neste resultado, a ação do *Trichoderma* é específica e pode variar de acordo com a cultura, substrato, o tempo da condução do experimento, a origem dos isolados de *Trichoderma*, a interação existente no ambiente com outros microrganismos, além da temperatura (MACHADO et al. 2012).

Apesar dos relatos da eficiência do *Trichoderma* em promover o crescimento expressivo em relação à testemunha de variadas culturas, relatos com resultados sem diferenças significativas foram evidenciado no trabalho de Almeida (2017) onde o *Trichoderma* não foi capaz de atuar na emergência de plântulas de gravioleira em todas as variáveis analisadas. Em outros trabalhos foi possível observar que alguns isolados de *Trichoderma* não promoveram o crescimento ou incrementou a biomassa vegetal. A gramínea forrageira *Brachiaria brizantha* cultivar marandu também não respondeu a inoculação com *Trichoderma harzianum* quando avaliados os parâmetros de altura, número de perfilhos e números de folhas (LIMA, 2014). Moreira (2016) avaliando o potencial de um produto comercial a base de *Trichoderma* seguindo as recomendações do fabricante, não obteve incremento em massa seca, altura e produtividade do pimentão Magali R.

Estudos envolvendo espécies medicinais e *Trichoderma* na promoção de crescimento ainda são poucos evidenciados na literatura, bem como em culturas que apresentem características semelhantes com a espécie em questão.

A origem dos isolados de *Trichoderma* pode influenciar na sua capacidade de promover o crescimento de plantas. No estudo realizado por RESENDE (2013)

demonstrou que isolados endofíticos não eram capazes de sintetizar hormônios responsáveis pelo crescimento da planta, entretanto, os isolados rizosféricos foram mais eficientes em sintetizar o hormônio do crescimento, o ácido indolacético, em comparação a cepa comercial de *Trichoderma asperellum*, além de promover o desenvolvimento de mudas de Guanandi, árvore medicinal de uso veterinário. HOWEL (2003), por sua vez menciona que o melhor método para se obter um agente potencial de biocontrole é isolar espécies de *Trichoderma* de solos, onde apenas o isolado TCS29 foi oriundo do solo, porém de uma região com temperaturas elevadas, diferente do local onde foi executado o experimento.

Em trabalhos encontrados com a cultura de *L. alba*, foi possível notar que quando os estudos envolviam microrganismos como fungos micorrizos arbusculares (FMA) e actinomicetos existiam sempre associação significativa destes com diferentes fontes de adubação orgânica, o que potencializava os resultados (GAMA et al., 2012; FREITAS et al., 2006).

O *Trichoderma* afeta diretamente as raízes de plantas, aumentando sua superfície de contato com o solo, e conseqüentemente aumentando da absorção de nutrientes pelas plantas (HARMAM et al., 2004), porém nesse estudo não houve resultado significativo para MSR. Esse fato pode estar relacionado ao processo de adaptação das plantas após o processo de mudança do local de cultivo, além dos microrganismos estarem em processo de colonização necessitando de assimilados da planta, gerou condições de estresse que não favoreceram o desenvolvimento das raízes (MENDONÇA; SILVA, 2019).

Os tratamentos utilizados no cultivo das mudas de *Lippia alba* influenciou na quantidade do óleo essencial extraído, onde as plantas que não foram submetidas a aplicação com o fungo *Trichoderma* apresentou um maior teor do óleo essencial (TABELA 2). Estudos relatando a eficiência do uso do *Trichoderma* na produção de metabólitos secundários são escassos e diante do estudo é possível observar que os isolados de *Trichoderma* fez com que a planta se adaptasse melhor ao ambiente, evitando que não fosse ativado seu mecanismo de defesa contra fatores adverso, conseqüentemente, menor foi o estímulo para a produção do óleo essencial, entretanto a utilização desses isolados pode ser de grande valia, para garantir a regulação no agroecossistema, pois promove uma melhor interação com o meio x planta.

Observou-se também na tabela 2 que o teor do óleo essencial extraído das mudas de *Lippia alba* foram superiores quando extraídos das plantas fresca,

evidenciando assim, que no processo de secagem o óleo presente nas folhas podem ser volatilizados. Quando avaliado o óleo extraído das folhas secas, ambas apresentaram um teor mais elevado, sendo em média de 66,1% quando comparado com a extração de folhas frescas.

TABELA 2. Teor (%) de óleo essencial extraído de plantas frescas e secas de *Lippia alba* e sem aplicação de diferentes isolados de *Trichoderma spp.* cultivadas em casa de vegetação.

TRATAMENTO	TEOR DE ÓLEO ESSENCIAL (%) m/m **	
	FRESCA*	SECA
TCS29	0,59 cA	0,21 B
TCS87	0,78 bA	0,26 B
TCS85	0,57 cA	0,23 B
CONTROLE	1,0 aA	0,26 B
CV(%)	18,14	19,08

* Houve diferença significativa a 1%** pelo teste de Tukey. Letra minúscula difere na coluna, letra maiúscula difere nas linhas.

Considerando o estudo de CORRÊA et al. (2004), avaliando métodos de secagem natural e em estufa com circulação forçada a 35°C de folhas de *Vernonia polyantes* (assa-peixe), demonstrou que a secagem em estufa reduziu o rendimento do óleo essencial, devido ao aumento da liberação dos compostos voláteis. O teor de óleo essencial de caule, raízes e folhas de *Tanaecium nocturnum* (cipó vick) foram inferiores à medida que aumentava a temperatura da secagem em comparação a extração de óleo quando as plantas estavam frescas, sendo que o teor do óleo essencial das folhas reduziu aproximadamente 90% quando extraída a 40°C (PIMENTEL et al., 2009).

Essa perda excessiva dos óleos essenciais pode estar relacionada com anatomia da planta, bem como o local onde está armazenado o óleo essencial. Embora o processo de secagem, desacelere a ação enzimática, evitando deterioração do vegetal, o processo de secagem das folhas de *Lippia alba* se mostra inviável pela perda excessiva do princípio ativo (PIMENTEL et al., 2009).

As plantas de *Lippia alba* quando cultivadas em campo, e submetidas a inoculação com isolados de *Trichoderma* apresentaram variáveis com médias superiores as plantas do controle (TABELA 3). O isolado TCS85 quando inoculado nas plantas foi capaz de gerar um maior número de hastes, não diferindo dos demais

isolados e diferindo do controle. Embora o NHASTES tenha sido superior e diferenciado estatisticamente do controle, a biomassa seca do caule não diferiu dentre os tratamentos avaliados, entretanto o NHASTES estimulou um maior surgimento de folhas, embora isso não tenha refletido na produção da biomassa foliar. As folhas são referência de produção de matéria seca através do processo fotossintético, sendo os demais órgãos da planta dependente da exportação da fitomassa (PEIXOTO; PEIXOTO, 2009).

A inoculação do fungo, de forma isolada e sem uma fonte de matéria orgânica, pode não contribuir na produtividade das plantas, sendo ideal a combinação de *Trichoderma* com outros microrganismos (BUCIO et al., 2015; COLLA et al. 2015). Yobo e colaboradores (2011), demonstrou que a combinação de *Trichoderma atroviride* e *Bacillus subtilis* promoveu um maior aporte de massa seca das plantas de feijão cultivados em campo.

O isolado TCS29, seguido dos demais isolados foi capaz de estimular o desenvolvimento das raízes das plantas. O gênero *Trichoderma* além de possuir diversas potencialidades como biocontrolador e promotor de crescimento vegetal tem a capacidade de crescer e funcionar na rizosfera em desenvolvimento (ALMANÇA, 2005; HARMAN, 2000). Segundo López- Bucio e colaboradores (2015) o *Trichoderma* é fitoestimulado através da múltipla comunicação com o sistema de raízes e brotações, ocasionando a liberação de auxinas, pequenos peptídeos, metabólitos voláteis e outros ativos que promovem a ramificação e capacidade de absorver nutrientes promovendo o crescimento de plantas e rendimento da biomassa.

Tabela 3. Produção de biomassa da de plantas de *Lippia alba* cultivadas em campo com e sem aplicação de diferentes isolados de *Trichoderma spp.* MFF= Massa fresca da folha; MSF= Massa Seca das Folhas; NHASTE= Número de Hastes; NFOLHAS= Número de Folhas; MFBF= Massa Fresca do Botão Floral; MFC= Massa fresca do caule; MSC= Massa Seca do Caule; MSBF= Massa Seca do Botão Floral; MSR= Massa Seca da Raiz;

TRATAMENTO	MFF ^{ns}	MSF ^{ns}	NHASTES*	NFOLHAS*	MBFB ^{ns}	MFC ^{ns}	MSC ^{ns}	MSBF ^{ns}	MSR*
TCS29	84,104	20,30	72,00 ab	2551,955ab	7,09	177,61	42,59	2,09	31,66a
TCS87	52,14	12,59	59,75 ab	2243,200ab	10,16	131,33	38,06	1,75	24,78ab
TCS85	78,58	18,97	76,36 a	2694,318a	6,48	161,59	42,59	2,13	29,83ab
CONTROLE	48,09	11,61	44,29 b	1500,118b	3,72	98,11	25,92	1,00	16,14b
Média	65,726	15,87	63,10	2247,4	6,86	142,16	37,29	1,74	25,60
CV(%)	19,57	27,8	29,49	32,14	78,5	37,3	36,21	52,26	37,65

^{ns}, *, ** = Não significativo, e significativo à 1% e 5%, respectivamente.

Para as variáveis que não houve diferença estatística, é possível notar que as maiores médias foram explicitas nas plantas submetidas a inoculação com o microrganismo (TABELA 3).

O tempo do cultivo das plantas em condições de campo podem ter sido curto para que os isolados de *Trichoderma* demonstrassem seus possíveis efeitos no incremento de biomassa. Michelin e colaboradores (2018) observou que o crescimento e desenvolvimento de plantas de alface foram significativos quando utilizou substrato a base de resíduos de criação de cavalos, inoculados com *Trichoderma spp.* no segundo ano de cultivo.

Não houve efeito significativo no teor de óleo essencial extraído das plantas que foram tratadas com diferentes isolados de *Trichoderma* no cultivo de *Lippia alba* em condições de campo (TABELA 4) demonstrando que as plantas se adaptaram as condições ambientais em que foram cultivadas, e que a inserção do microrganismo no sistema de cultivo pode se constituir de uma nova ferramenta, visando a ampla potencialidade que pode desenvolver, protegendo o ambiente.

Tabela 4. Teor (%) de óleo essencial extraído de folhas secas de *Lippia alba* submetidas ao tratamentos com e sem aplicação de diferentes isolados de *Trichoderma spp.* cultivadas em campo.

TRATAMENTO	TEOR DE ÓLEO ESSENCIAL (%) m/m ^{ns}
TCS29	1,55
TCS87	1,69
TCS85	1,67
CONTROLE	1,59
CV(%)	15,96

^{ns}: Não houve diferença significativa

A produção de óleo essencial da planta é influenciada por variados fatores que afetam o metabolismo secundário das plantas. Estudos desse cunho estão sendo cada vez mais enfatizados, desde os fatores que influenciam no desenvolvimento da planta, até o pós-colheita. Cada espécie vegetal possui sua particularidade, não podendo generalizar o efeito desses fatores sobre a mesma.

CONCLUSÃO

Em função dos resultados obtidos pôde-se concluir que a associação dos isolados de *Trichoderma spp.* no cultivo de *Lippia alba* atribui um desenvolvimento

satisfatório na produção de mudas e em cultivos em campo, por garantir sua adaptação ao ambiente e não influencia na produção de óleo essencial. Entretanto a extração do óleo essencial das folhas frescas é mais viável.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de estudos e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e a FAPESB (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia) pelo suporte financeiro e ao programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, pelo desenvolvimento do curso de mestrado.

REFERÊNCIAS

ALMANÇA, M.A.K. - ***Trichoderma sp.* no controle de doenças e na promoção do crescimento de plantas de arroz.** 2005, 81f. Dissertação. (Mestrado em Ciências Agrárias), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, 2005.

ALMEIDA C. L. S. **Uso de *Trichoderma spp.* na emergência de plântulas de gravioleira e produção de mudas em diferentes substratos e ambientes.** 2017, 97 f. Dissertação (Mestrado em Horticultura Tropical) Universidade Federal de Campina Grande, Pombal-PB, 2017.

ALMEIDA, L. et al. Bioatividade de óleos essenciais na germinação e no vigor em sementes de tomate. **Biotemas**, Florianópolis, v. 32, n. 2, p. 13-21, jun. 2019.

AMARAL, P. P. et al., Promotores de crescimento na propagação de caroba. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 37, n. 90, p. 149-157, 2017.

AZARMI, R. Effect of *Trichoderma* isolates on tomato seedling growth response and nutrient uptake. **African Journal of Biotechnology**, [s.l.], v. 10, n. 31, p.5850-5855, 29 jun. 2011

BANDEIRA JUNIOR, G. et al. Óleos essenciais de plantas contra bactérias isoladas de peixes: uma triagem in vitro e eficácia in vivo de *Lippia origanoides*. **Ciência Rural** [online], vol.49, n.6, 2019

BROETTO, L. **Antagonismo a *Macrophomina phaseolina* e promoção do crescimento em feijoeiro mediados por *Trichoderma spp.*** 2013. 61 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon, 2013.

BUCIO, J. L. et al. *Trichoderma* as biostimulant: exploiting the multilevel properties of a plant beneficial fungus. **Scientia Horticulturae** v.196, p.109-123, 2015.

CARVALHO Z. S. *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown: **CARACTERIZAÇÃO E POTENCIAL FITOQUÍMICO**. 2017. 97 f. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas-Ba, 2017.

COLLA, G. et al. Co-inoculation of *Glomus intraradices* and *Trichoderma atroviride* acts as a biostimulant to promote growth, yield and nutrient uptake of vegetable crops. **Journal of the Science of Food and Agriculture** v.95 p.1706- 1715, 2015.

DANIEL, O. et al. Aplicação de fósforo em mudas de *Acacia mangium* WILLD. **Revista Árvore**, v. 21, n. 2, p. 163-168, 1997.

FREITAS, M. S. M. et al. Crescimento e composição da menta em resposta à inoculação com fungos micorrízicos arbusculares e adubação fosfatada. **Horticultura Brasileira** - v24, n.10, 2006

CORRÊA, R. M. et al. Rendimento de óleo essencial e caracterização organoléptica de folhas de assa-peixe submetidas a diferentes métodos de secagem. **Ciências Agrotécnicas**. Lavras, v.28, nº 2, p.341-346, 2004.

GAMA, et al., Produção de biomassa de erva-cidreira [*Lippia alba* (Mill.) N.E.Br.] sob adubação com composto de capim elefante inoculado e sem inoculação de actinomicetos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.14, p.163-168, 2012.

GOBBO-NETO L.; LOPES, P. N. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v.30, n. 2, 2007.

GUIMARÃES, C.C. et al., Atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato aquoso e do óleo essencial do alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) e do cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticus* L.) frente a cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Revista Brasileira de Biociência**, v.15, n.2, p.83–89, 2017.

HARMAN, G. E. Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant Disease**, v.84, n.4 p.376–393, 2000.

Harman, G. E. et al., Interactions between *Trichoderma harzianum* Strain T22 and maize inbred line Mo17 and effects of these interactions on diseases caused by *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. **Plant Physiology**, v.94, n.2, p.146-153, 2004.

HIRATA, D. B. et al. Allelopathic effect of the essential oil of *Cymbopogon nardus* and *Annona muricata* extract on the germination of *Bidens pilosa* and *Megathyrus maximus*. **Revista de Ciências Agrárias**, Lisboa, v.41, n.3, p.141-150, 2018.

HOWELL, C. R. Mechanisms Employed by *Trichoderma* species in the Biological Control of Plant Diseases: The History and Evolution of Current Concepts. **Plant Disease**, v.87, n.1, p.4-10, 2003.

LEANDRO, L. F. S. et al., Population dynamics of *Trichoderma* in fumigated and compostamended soil and on strawberry roots. **Applied Soil Ecology**, v. 35, p.237-246, 2007.

LIMA, V. G. A. **utilização de *Trichoderma harzianum* na produtividade da *Brachiaria brizantha* cv. Marandu**. São José dos Campos. SP/ UNICASTELO, 2014.

MACHADO, D. F. M. et al., *Trichoderma* no Brasil: o fungo e o bioagente. **Revista de Ciências Agrárias**, Lisboa, v. 35, n. 1, p. 274-288, 2012.

MARCHESE, J.A. et al., Estacas de diferentes diâmetros na propagação de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. – Verbenaceae. **Revista brasileira de plantas medicinais**, Botucatu, v.12, n.4, 2010.

MATTOS, S.H. **Estudos fitotécnicos da *Mentha arvensis* L. var. *piperacens* Holmes como produtora de mentol no Ceará**. Tese (Doutorado - Fitotecnia), 98p. - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2000.

MENDONÇA D.P.; SILVA F.B.B. ***Trichoderma* e bactérias endofíticas para promoção de Crescimento na aclimatização e formação de mudas de Pimenteira-do-reino provenientes do cultivo *in vitro***. TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO (Graduação em Agronomia) UFRA, Belém-PA, 2019.

MICHELON C.J. et al., Vermicomposto bioenriquecido com *Trichoderma spp.* **Revista de Ciências Agroveterinárias**. Lages- SC, v.17, n.1, 2018.

MOREIRA B. M. **Promoção de crescimento e incremento de produtividade por trichordermil@1306 em pimentão (*Capsicum annum* I)**. Trabalho de conclusão de curso em Agronomia. IFMG – São João Evangelista-Minas Gerais – 2016.

NEGRINI, M. et al. Atividade inseticida de óleos essenciais para o controle da lagarta-do-cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda*. **Arquivo Instituto Biológico**. v.86, 2019.

PAULUS D; VALMORBIDA R; TOFFOLI E; NAVA GA.. Teor e composição química de óleo essencial de cidró em função da sazonalidade e horário de colheita. **Horticultura Brasileira**, v.31, p.203-209, 2013.

PEIXOTO C.; PEIXOTO M.F.S.P. **Dinâmica do crescimento vegetal: princípios básicos**. In: CARVALHO C.A.L. et al. Tópicos em ciências agrárias. Cruz das Almas: Nova Civilização p. 37-53, 2009

PIMENTEL F. A. et al. Influência da temperatura de secagem sobre o rendimento e a composição química do óleo essencial de *Tanaecium nocturnum* (barb. Rodr.) bur. & K. Shum. **Química Nova**, vol.31, nº.3, São Paulo, 2009

POMBO, J. C. P. et al., Efeito antimicrobiano e sinérgico de óleos essenciais sobre bactérias contaminantes de alimentos. **Segurança Alimentar E Nutricional**, v25, n.2, p.108-117, 2018.

POMELLA, A.W.V.; RIBEIRO, R.T.S. Controle biológico com *Trichoderma* em grandes culturas - uma visão empresarial. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. (Ed.). Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas. Jaguariúna: **Embrapa Meio Ambiente**, p.239-244, 2009.

RESENDE M. P. **Isolados de *Trichoderma spp.* obtidos de raízes de guanandi (*Calophyllum brasiliense* camb.) para promoção do seu crescimento *in vitro*.** Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias), 77f. IF GOIANO, Rio Verde-GO, 2013.

SANTOS, A.S. et al. **Descrição de Sistema e de Métodos de Extração de Óleos Essenciais e Determinação de Umidade de Biomassa em Laboratório.** EMBRAPA, 2004. (Comunicado Técnico)

SIMÕES, C.M.O. et al., **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 6.ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS: Florianópolis: Editora da UFSC, 2010. 1104p.

TELES S. **Avaliação do teor e da composição química das folhas de *Lippia alba* (Mill) n.e.br. e *mentha piperita* l. cultivadas em Cruz das Almas, Santo Antônio de Jesus e Amargosa, submetidas às diferentes épocas de colheita e processos de secagem.** DISSERTAÇÃO, (Mestrado em Ciências Agrárias) - UFRB, Cruz das Almas-BA, 2010.

YOBO K.S. et al. Effects of single and combined inoculations of selected *Trichoderma* and *Bacillus* isolates on growth of dry bean and biological control of *Rhizoctonia solani* damping-off. **African Journal of Biotechnology** v.10, p.8746-8756, 2011

ARTIGO 2

**ATIVIDADE ANTIFUNGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia alba* (Mill.) N.
E. Brown EM *Aspergillus welwitschiae* E *Fusarium oxysporum* f sp.
 *cubense***

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA
SETEMBRO DE 2020**

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown EM *Aspergillus welwitschiae* E *Fusarium oxysporum* f sp. *cubense*

RESUMO:

O uso de plantas medicinais como fontes de novos fármacos tem se destacado nos últimos tempos, visto que os medicamentos sintéticos tem ocasionado a resistência dos fitopatogenos, dificultando o seu controle. Sendo assim, o uso dos óleos essenciais tem sido uma estratégia eficaz no controle do crescimento microbiano, reduzindo os impactos que podem causar ao ambiente e ao homem. Contudo, o estudo objetivou avaliar a atividade “*in vitro*” dos óleos essenciais de *Lippia alba* no controle dos fitopatogenos *Aspergillus welwitschiae* e *Fusarium oxysporum* sp. *cubense*. Os óleos essenciais foram extraídos em aparelho cleverger, pelo método da hidrodestilação. Foram utilizados óleos essenciais de folhas *Lippia alba* submetidas ao tratamentos com diferentes isolados de *Trichoderma spp.* em seu cultivo, entretanto esse fator interferiu nas concentrações entre 0 e 2 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ para algumas variáveis analisada no controle do fitopatogeno *A. welwitschiae*, e entre as concentrações 1 e 4 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ para o *F. oxysporum*. A concentração mínima inibitória (CIM) foi de 1 e 2 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ para *A. welwitschiae* e *F. oxysporum* respectivamente e o efeito fungicida foi obtido na concentração de 6 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ apenas para o fitopatogeno *A. welwitschiae*. A inibição completa do fungo em contato direto com o óleo essencial diluídos em meio BDA foi de 2 e 4 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ para o *A. welwitschiae* e *F. oxysporum* respectivamente. A inibição completa na germinação de esporos foi obtida na concentração 1 e 4 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ para *A. welwitschiae* e *F. oxysporum* respectivamente. Com o presente resultado e possível afirmar que o óleo essencial de *Lippia alba* pode ser eficaz no controle dos agentes epidemiológico da Podridão vermelha do sisal, e do mal do panamá em bananeiras.

Palavras-chave: Controle biológico, fungos fitopatogenos, plantas medicinais

INTRODUÇÃO

O Brasil possui ampla diversidade vegetal, e grande ocorrência do conhecimento popular ligado ao científico sobre as potencialidades das plantas medicinais e seus princípios ativos (FERNANDES et al. 2019; DANTAS et al., 2018).

Visto à necessidade de reduzir os impactos que são causados no ambiente, e ao homem pelo uso de produtos sintéticos, além de desencadear a resistência de patógenos, a busca por métodos mais seguros, eficientes e viáveis tem ganhado espaço no cenário mundial, e têm sido alvo de estudos no intuito de inibir o desenvolvimento de fitopatógenos (TICO et al., 2019 TAVECHIO et al., 2018; PEIXINHO et al., 2017).

Os óleos essenciais apresentam grande variabilidade e quantidade dos componentes bioativos, exercendo papel fundamental na defesa contra vários microrganismos (MAIA et al., 2015). O óleo essencial extraído de plantas de *Lippia alba*, apresentam ampla diversidade em seus componentes (CARVALHO, 2017; JANNUZZI, 2006), devido a sua variabilidade fenotípica ou química que se diferencia em variados quimiotipos de acordo com o componente majoritário (CAMÊLO, 2010). Diversos estudos demonstram que esses óleos também possuem atividade antifúngica, antibacteriana, inseticida, nematicida, dentre outros (MOREIRA et al., 2015; NOGUEIRA et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2006; ESCOBAR et al., 2010).

Existem diversos relatos da eficácia dos compostos químicos que compõem os óleos essenciais, inibindo a atividade fúngica, a exemplo da carvona, componente majoritário de um dos quimiotipos da *Lippia alba* (COSTA et al., 2017; NERI, et al. 2007). Peixoto e colaboradores (2018) comprovou que os quimiotipos de *Lippia alba* com enantiômeros de carvona e citral, inibiram o crescimento dos fitopatogênicos *Lasiodiplodia theobromae*, *Fusarium pallidoroseum* e *Fusarium solani*, com efeito fungicida mesmo em baixas concentrações. Esse efeito também foi comprovado por TOMAZONI e colaboradores (2016) no controle de *Alternaria solani*, utilizando óleo essencial de *L. alba* do quimiotipo Citral e linalol.

Entretanto, testar a ação do óleo essencial de *L. alba* no controle de fungos fitopatogênicos de culturas com importância econômica, tais como o

Aspergillus welwitschiae, causador da podridão vermelha do sisal, e o *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, agente causal do mal do panamá em bananeira, pode ser de grande valia, na geração de novos produtos naturais.

Sendo assim, objetivou-se avaliar a atividade antifúngica dos óleos essenciais na inibição do crescimento dos fitopatógenos *Aspergillus welwitschiae* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*.

MATERIAIS E METÓDOS

Material vegetal e extração do óleo essencial

Após o cultivo das plantas de *Lippia alba* submetidas a inoculações com fungos do gênero *Trichoderma spp.*, as plantas foram colhidas do campo experimental do centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia para posterior extração do óleo essencial. As plantas foram colhidas no mês de agosto, após 150 dias do transplante. As folhas foram submetidas a secagem à 45°C em estufa de circulação forçada, para posterior extração do óleo essencial pelo método da hidrodestilação em aparelho Clevenger, por 120 minutos após a condensação da primeira gota.

Obtenção dos Microrganismos

Os microrganismos fitopatogênicos *Aspergillus welwitschiae* e *Fusarium oxysporum cubense* foram oriundo da coleção de microrganismos do Laboratório de Microbiologia do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Ambos foram reativados em placas de Petri contendo meio de cultura Batata Dextrose Agar (BDA) e incubado à uma temperatura de 28°C em BOD.

Atividade antifúngica

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A CIM foi realizada através da técnica modificada de microdiluição descrita pelo M27-A2 da Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008) utilizando placas de 96 poços. As concentrações dos óleos essenciais de foram de 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 6,0 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ para ambos microrganismos e três

controles: 1- BD + microrganismo; 2- Diluente Tween 20 (5%) + microrganismo e 3- Antifúngico (Ciclopirox de Olamina $400 \mu\text{L.mL}^{-1}$) + microrganismo. Foi adicionado $50 \mu\text{L}$ da suspensão de esporos do microrganismo numa concentração de 1×10^6 conídios. mL^{-1} em cada poço. Em seguida foi adicionado $100 \mu\text{L}$ de cada concentração, totalizando um volume final de $150 \mu\text{L}$ em cada poço. No experimento foram realizadas em triplicata e foram repetidas duas vezes para confirmação dos resultados. A atividade antifúngica foi detectada após 72h de incubação a 28°C . Observou-se visualmente o crescimento fúngico comparado ao controle 1 e determinou-se como MIC a menor concentração capaz de impedir o crescimento do microrganismo.

Determinação da concentração fungicida mínima (CFM)

Após o teste anterior da CIM, nos poços onde não foi possível visualizar o crescimento do inóculo, foi retirada uma alíquota do conteúdo, e feito o subcultivo em placas de Petri contendo meio de cultura BDA, suplementado com antibiótico. Após incubação por 48 horas, com temperatura à $28 \pm 2^\circ\text{C}$, foi considerada a CFM a menor concentração do óleo essencial em que o microrganismo não se desenvolveu.

Germinação de esporos

O protocolo descrito na determinação da Concentração Inibitória Mínima, foi o mesmo utilizado para o ensaio da germinação de esporos, sendo as microplacas incubadas a $28 \pm 2^\circ\text{C}$. Entre 12 e 16 horas após a incubação, o processo foi paralisado utilizando-se lactoglicerol e avaliou-se a porcentagem de germinação em microscópio de luz. Os esporos foram considerados germinados quando o comprimento do tubo germinativo era duas vezes maior que o tamanho do esporo.

Análise de crescimento micelial

Os óleos essenciais extraídos das plantas que foram tratadas com diferentes isolados de *Trichoderma* ssp, foram previamente diluídos em Tween 20® a 5% e adicionados ao meio de cultura BDA obtendo-se as seguintes

concentrações para 0,25; 0,50; 1,00; 2,00; 4,00 e 6,00 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ para ambos microrganismo. O óleo essencial diluído no Tween foi adicionado ao meio de cultura BDA, quando esse se encontrava na temperatura próxima ao ponto de solidificação. Para avaliação dos diferentes tratamentos no crescimento micelial do fungo *Aspergillus welwitschiae* foi retirado um pequeno fragmento da cultura com auxílio de uma agulha hipodérmica e para o *Fusarium Oxysporum* foi retirado disco de micélio com aproximadamente mm de diâmetro e inserido no centro da placa de Petri de 5cm de diâmetro, o tratamento controle consistiu na inoculação do fungo em meio BDA e BDA com Tween 20® a 5%. As placas foram incubadas em câmara de BOD 28 ± 2 °C. Sendo as avaliações realizadas após o crescimento total do microrganismo na placa controle, onde foi medido o diâmetro em dois sentidos perpendiculares.

Índice de velocidade de crescimento

O índice de velocidade de crescimento (IVC), foi calculado conforme a seguinte fórmula de Oliveira (1991): $IVC = [(\sum(D-D_a))/N]$, sendo IVC: índice de velocidade de crescimento micelial, D: diâmetro médio atual da colônia, D_a : diâmetro médio da colônia do dia anterior, N: número de dias após a inoculação.

Número de esporos

A avaliação de número de esporos do *Aspergillus welwitschiae* e do *Fusarium oxysporum* foi realizada no final do experimento, após o crescimento total do microrganismo nas placas do controle. Sendo adicionado a cada placa de Petri 10mL de água destilada e uma gota de Tween 20®, posteriormente foi feita a suspensão dos propágulos fúngico e retirou-se uma alíquota com a ajuda de uma pipeta e realizou-se a contagem de esporos em câmara de Neubauer e microscópio óptico. O número de esporos produzidos foi expresso em números de esporos por mL

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O potencial dos óleos essenciais e sua relação com a atividade antimicrobiana tem sido alvo de diversos estudos, pois a sua composição

química pode exercer influência direta sobre as suas atividades biológicas (GUIMARÃES et al., 2014, RUSSO et al., 2013).

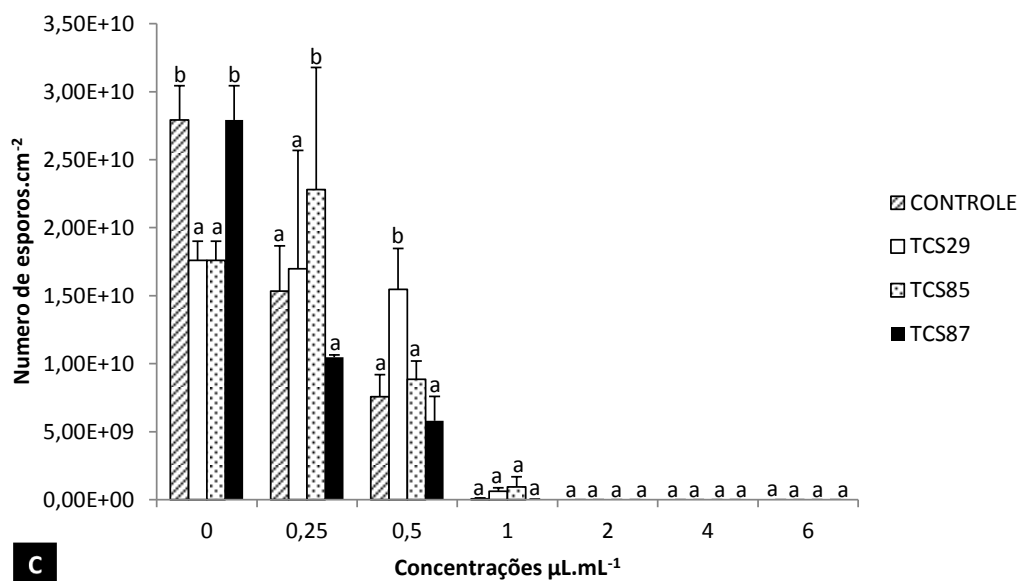
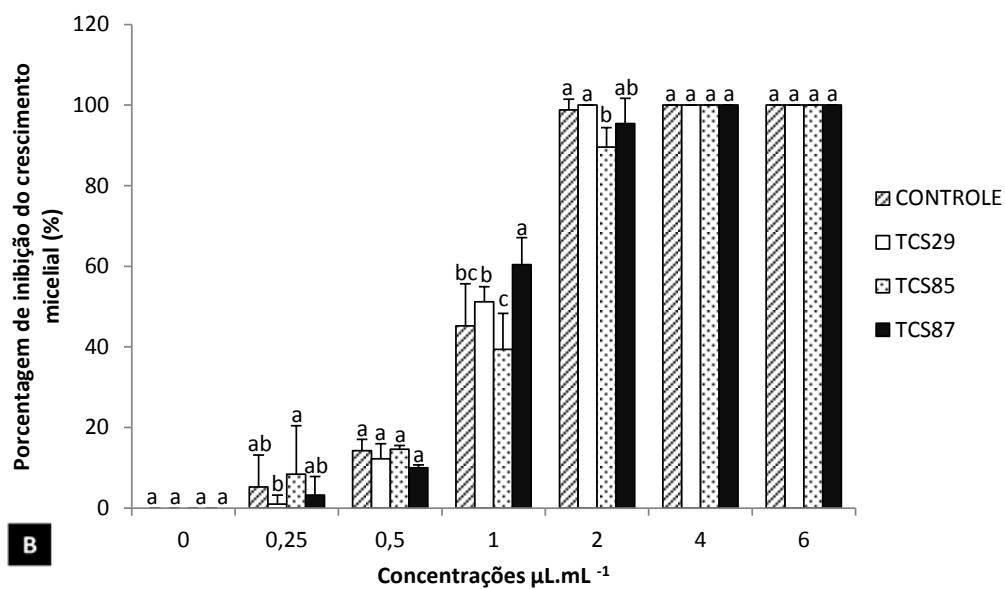
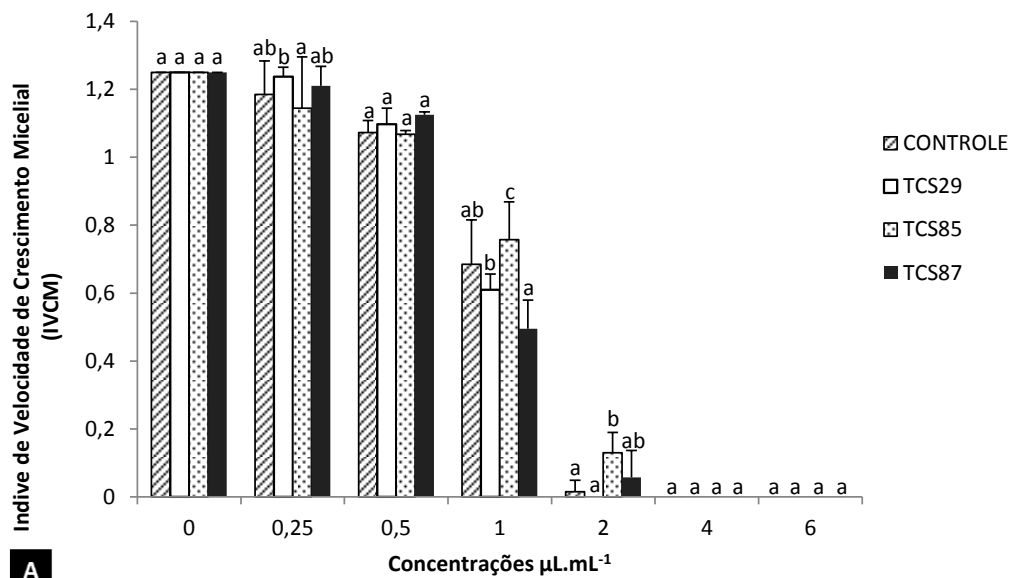
A tabela 5 mostra os resultados dos ensaios utilizando o método da microdiluição, realizados para a determinação da CIM e da CFM dos óleos essenciais de *Lippia alba* tratadas com diferentes isolados de *Trichoderma spp.* em seu cultivo. Observa-se que todos os óleos essenciais de *Lippia alba* independente do tratamento foi capaz de inibir o crescimento fúngico dos fitopatógenos *A. welwitschiae* e *F. oxysporum*.

TABELA 5: Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) do óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown submetida à inoculação de diferentes isolados de *Trichoderma spp.* contra o fungo *Aspergillus welwitschiae* e *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense.

TRATAMENTOS	CONCENTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL ($\mu\text{l.mL}^{-1}$)			
	<i>Aspergillus welwitschiae</i>		<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. cubense	
	CIM	CFM	CIM	CFM
TCS29	1,0 a	6,0 a	2,0 a	-
TCS87	1,0 a	6,0 a	2,0 a	-
TCS85	1,0 a	6,0 a	2,0 a	-
CONTROLE	1,0 a	6,0 a	2,0 a	-

A CIM foi de 1,0 e 2,0 $\mu\text{l.mL}^{-1}$ para *A. welwitschiae* e *F. oxysporum* respectivamente, enquanto que a CFM foi 6,0 $\mu\text{l.mL}^{-1}$ sendo possível determinar apenas para o fitopatógeno *A. welwitschiae*, sendo necessária uma concentração maior que fosse letal para o *F. oxysporum*. A inibição do crescimento fúngico pode ser de forma temporária ou permanente, e isso depende de vários fatores, incluindo os elementos químicos que compõem o óleo essencial e sua interação biológica, pois um óleo pode ter ação contra vários microrganismos, entretanto as concentrações inibitórias podem variar.

Vários óleos essenciais apresentam potencial no controle de fungos patogênicos, exercendo ação direta ao inibir o crescimento micelial e germinação de esporos, além de induzir a produção de fitoalexina (OOTANI et al., 2013). A utilização do óleo essencial de *Lippia alba* no controle dos fitopatogenos em estudo, foi capaz de reduzir o crescimento micelial e o número de esporos produzidos a medida que a concentração era aumentada (Figuras 7 e 8).



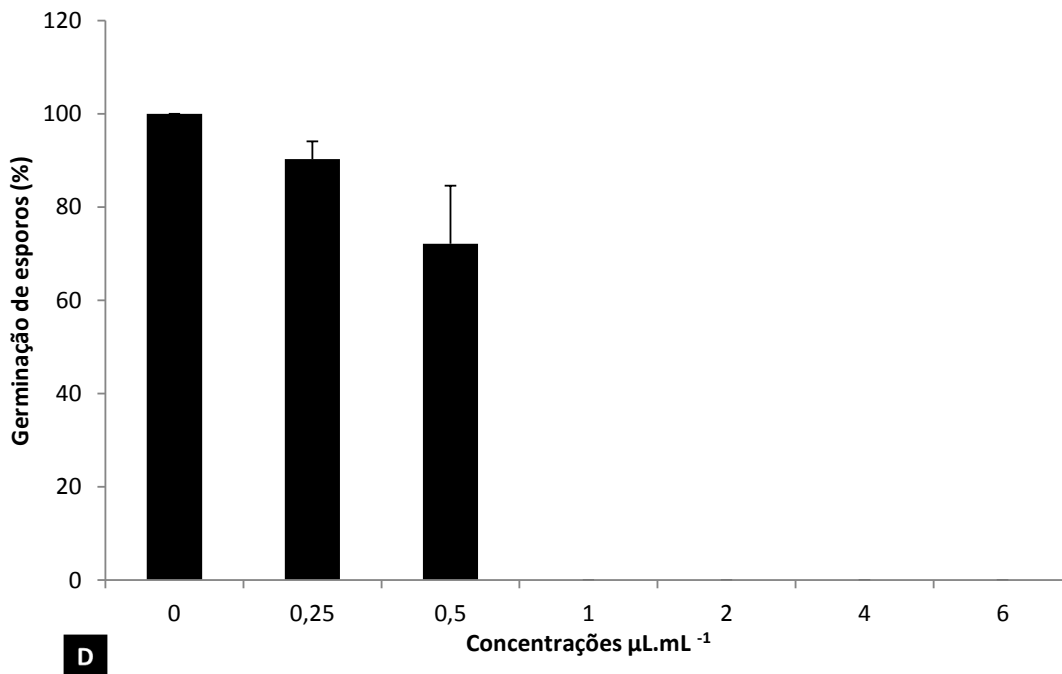
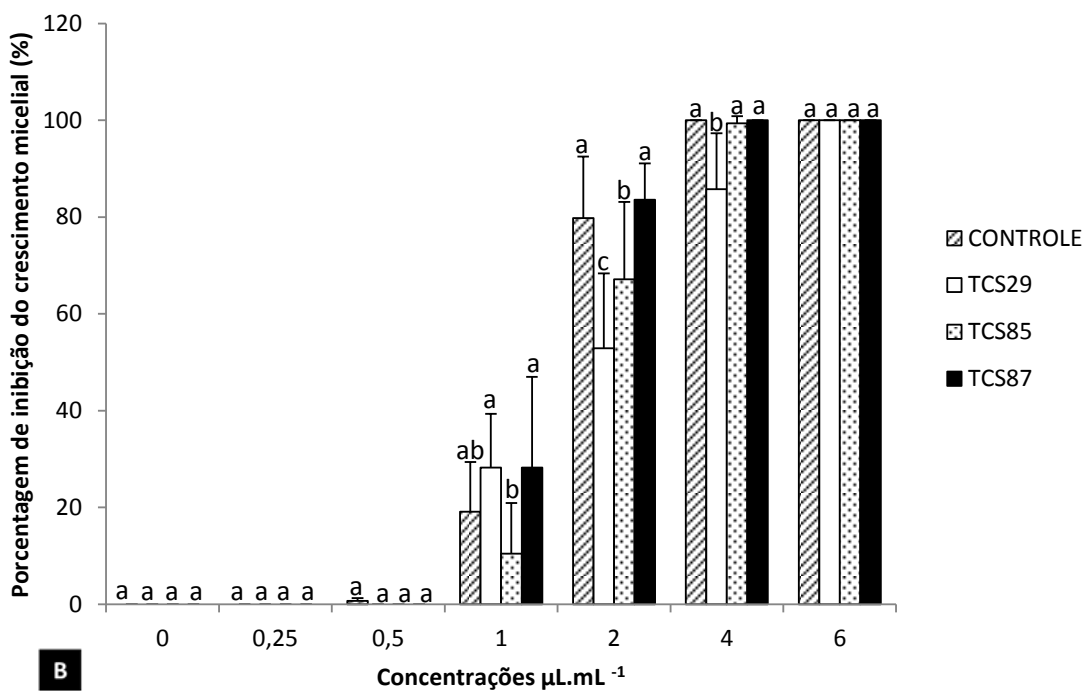
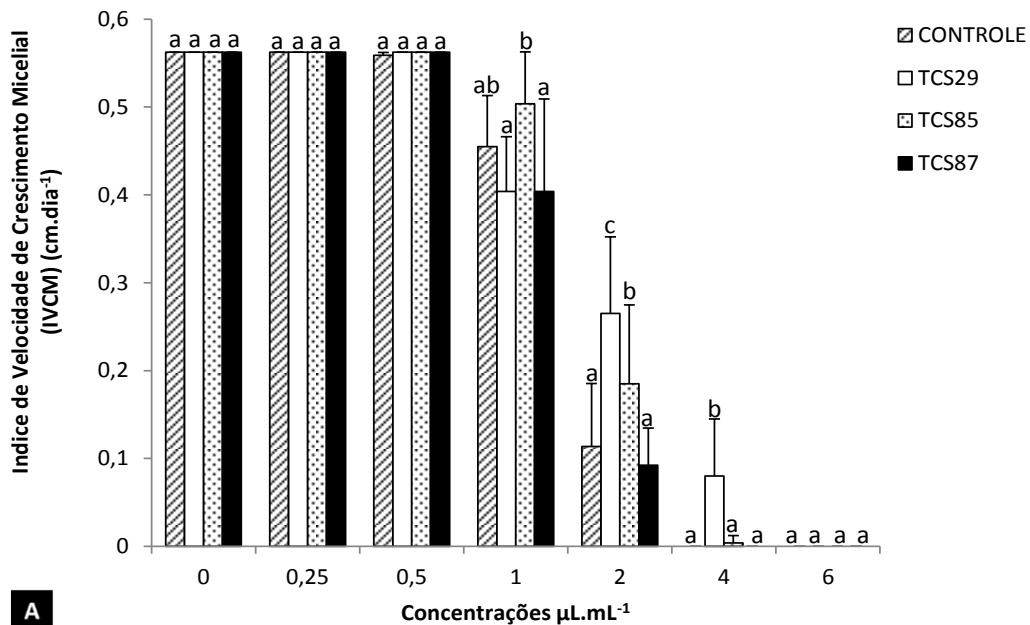
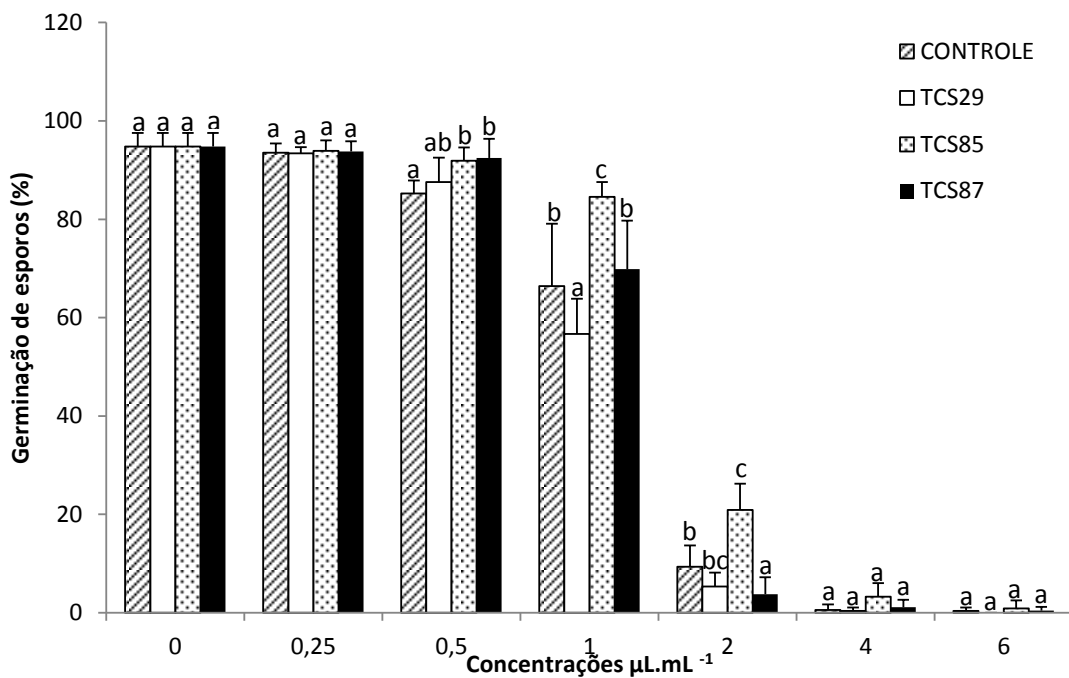


Figura 5: Efeito de diferentes concentrações dos óleos essenciais de *Lippia alba*, submetidas ao tratamento com diferentes isolados de *Trichoderma spp.* no índice de velocidade de crescimento micelial (cm.dia⁻¹) (A); Porcentagem de inibição do crescimento micelial (%) (B); Números de esporos.cm² (C); Germinação de esporos (%) (D) do fitopatógeno *Aspergillus welwitschiae*.





C

Figura 6: Efeito de diferentes concentrações dos óleos essenciais de *Lippia alba*, submetidas ao tratamento com diferentes isolados de *Trichoderma spp.* no índice de velocidade de crescimento micelial (cm.dia⁻¹) (A); Porcentagem de inibição do crescimento micelial (%) (B); Germinação de esporos (%) (C) do fitopatógeno *F. oxysporum f. sp. cubense*.

Quando submetido a concentração a 1 µL.mL⁻¹ do óleo essencial de *Lippia alba*, o *Aspergillus* apresentou crescimento micelial diário médio de 0,63cm quando comparado ao controle e as concentrações abaixo de 1 µL.mL⁻¹ que era de 1,17 cm (Figura 5). Carvalho (2017) avaliando o efeito do óleo essencial de *Lippia alba* sobre o crescimento de *A. niger*, observou redução significativa do crescimento micelial do fitopatogeno. A concentração de 2 µL.mL⁻¹ do óleo essencial de *L. alba* retardou o crescimento de do *Fusarium oxysporum* reduzindo a sua taxa de desenvolvimento em torno de 29,15% (Figura 6).

A partir da concentração de 2,0 e 4 µL.mL⁻¹ foi possível notar quase 100% da inibição do crescimento do fungo *A. welwitschiae* e *F. oxysporum* respectivamente (Figuras 5 e 6). Os óleos essenciais extraídos das plantas que foram tratadas com os isolados TCS 29 e TCS 87 e as que não foram submetidas a nenhum tipo de tratamento se destacaram quando utilizada na concentração com 2 µL.mL⁻¹, entretanto para o controle do *F. oxysporum* os tratamentos destacados foram o TCS87, TCS85 e o controle (Figuras 5 e 6). A verificação da viabilidade dos esporos foi validada ao observar os controles, sendo que óleos essenciais utilizados inibiram 100% da germinação de esporos dos fungos de *A. welwitschiae* e *F. oxysporum* a partir da concentração de 1 e 2 µL.mL⁻¹ respectivamente

Para o *Aspergillus* e *Fusarium* as concentrações de óleo testadas foram capaz de inibir o crescimento micelial, produção e germinação de esporos, entretanto o *Aspergillus* demonstrou uma maior sensibilidade em concentrações menores (Figura 7). É importante considerar que os fungos apresentam morfologias distintas e o óleo essencial pode não atuar diretamente rompendo as membranas celulares das hifas e conídios, facilitando a permeabilidade celular e consequente a perda de macromoléculas essenciais (COSTA et al., 2011).

Brum (2012) destaca em seu estudo que o óleo essencial de erva cidreira aplicado na mesma dose, apresenta efeito diferente entre os patógenos, inibindo na concentração $1 \mu\text{l.mL}^{-1}$ inibiu o desenvolvimento de *Pyricularia grisea* e *Colletotrichum graminicola*, mas para o patógeno *Helminthosporium sp.* nenhuma das doses analisadas entre 0 e $1,25 \mu\text{l.mL}^{-1}$ inibiu o seu crescimento.

Em alguns estudos com fungos do gênero *Aspergillus spp*, foi possível observar que o óleo essencial de orégano foi capaz ocasionar a perda do citoplasma e ruptura da estrutura celular, e o óleo essencial de tomilho rompeu e destruiu a membrana plasmática e mitocondrial. (MITCHELL et al., 2010, RASSOLI et al., 2006)

Em outros estudos concentrações mais baixas do OE de *Lippia alba* são capazes de inibir 100% do crescimento de outros fitopatogenos (TOMAZONI et al., 2016). Sousa e colaboradores (2018) verificou que a concentração de $1,25 \mu\text{l.mL}^{-1}$ do óleo essencial de erva cidreira ocasionou efeito fungicida sobre o *Fusarium spp.* isolado do caju e do pimentão, além de retardar o desenvolvimento de *Fusarium spp.* isolado do milho. Entretanto o óleo essencial de pimenta longa só conseguiu inibir o crescimento do *Fusarium oxysporum* em concentrações elevadas acima de $1000 \mu\text{g.ml}^{-1}$ (ZARCONI et al., 2009).

Os óleos essenciais age de forma particular a depender do vegetal e da susceptibilidade dos microrganismos (ANTUNES E CAVACO, 2010). Retardar ou inibir o desenvolvimento de microrganismo fitopatogênicos é uma estratégia eficiente para o não surgimento de doenças que afetam a produção agrícola.

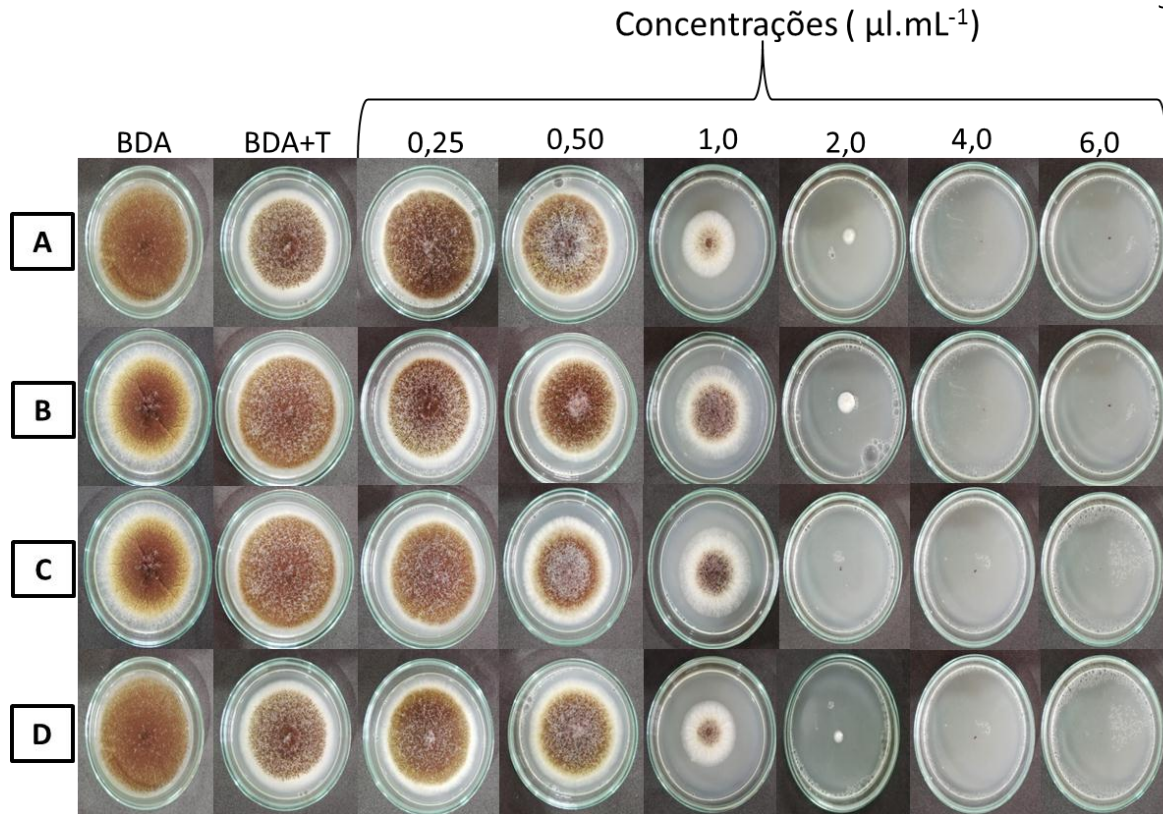


Figura 7: Crescimento micelial de *Aspergillus welwitschiae*, após 4 dias de incubação em meio de cultura com a adição de diferentes óleos essenciais de *Lippia alba*, em seis concentrações. Óleo essencial extraído de *Lippia alba*, sem inoculação de *Trichoderma spp.* (A); Óleo essencial extraído de *Lippia alba*, com inoculação do isolado TCS85. (B); Óleo essencial extraído de *Lippia alba*, com inoculação do isolado TCS29 (C); Óleo essencial extraído de *Lippia alba*, com inoculação do isolado TCS87 (D).

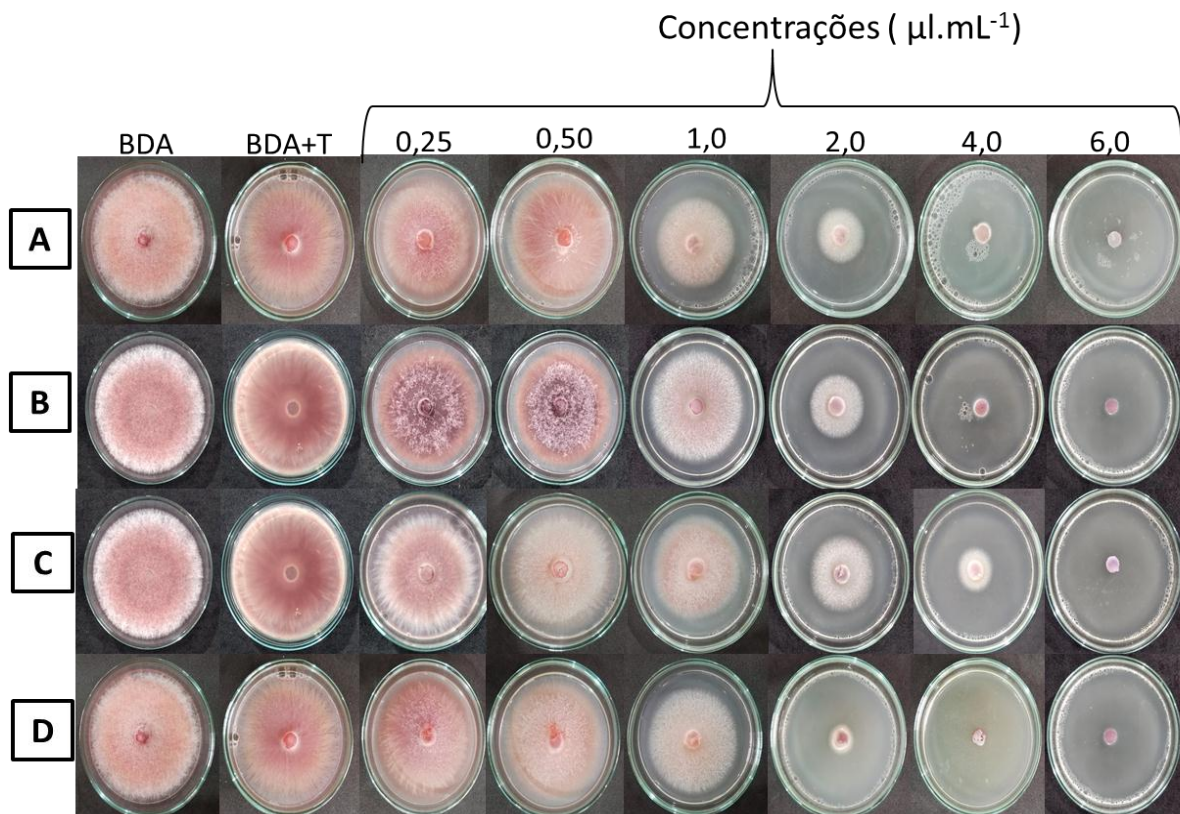


Figura 8: Crescimento micelial de *Fusarium oxysporum f. sp. cubense*, após 7 dias de incubação em meio de cultura com a adição de diferentes óleos essenciais de *Lippia alba*, em seis concentrações. Óleo essencial extraído de *Lippia alba*, sem inoculação de *Trichoderma spp.* (A); Óleo essencial extraído de *Lippia alba*, com inoculação do isolado TCS85. (B); Óleo essencial extraído de *Lippia alba*, com inoculação do isolado TCS29 (C); Óleo essencial extraído de *Lippia alba*, com inoculação do isolado TCS87 (D).

Os elementos que compõem os óleos essenciais do gênero *Lippia* possuem composição química similar, entretanto, a quantidade desses componente é que varia entre as espécies (CRUZ et al., 2013) e sofrem interferência direta das condições nas quais o material vegetal foi submetido em seu cultivo e o processo da extração do óleo essencial (MELO et al., 2013, MENDES et al., 2010). A presença de alcaloides e taninos presente nas folhas de *Lippia alba* pode justificar a atividade antimicrobiana

Embora a composição dos óleos essenciais utilizados no presente trabalho não seja conhecida, a planta matriz que deu origem as novas plantas tinham como componentes majoritários carvona, limoneno e germacreno D (CARVALHO, 2017).

O sinergismo e/ou antagonismo decorrente da alta complexidade química dos óleos essenciais é que promovem o controle microbiano, além da sua associação a múltiplos mecanismos de ação que atuam em diversos alvos ao mesmo tempo, ao contrário dos fungicida sintético que atua em apenas um alvo facilitando a resistência do microrganismo.

O controle dos fitopatogenos *A. welwitschiae* e *F. oxysporum* só foi possível em concentrações mais elevadas, entretanto, pensando na economia do óleo essencial associar a outras técnicas de manejo poderiam promover também o controle do fitopatógeno.

Apesar dos resultados satisfatórios obtidos nesse trabalho, é imprescindível estudos futuros que abordem o controle *in vivo* destes fitopatogenos, pois o efeito do óleo essencial pode apresentar outro comportamento quando em contato com o patógeno associado ao seu hospedeiro.

CONCLUSÃO

O óleo essencial de *Lippia alba*, independente dos tratamentos utilizados em seus cultivo, apresentou efeito fungicida para o *A. welwitschiae* na concentração de 6 $\mu\text{l.mL}^{-1}$ entretanto para o fungo *F. oxysporum* só foi possível notar a ação fungistática, quando em contato direto com o óleo essencial de *Lippia alba*. No entanto faz-se necessário novos estudos a fim de validar esse resultado quando em contato com o hospedeiro.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de estudos e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e a FAPESB (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia) pelo suporte financeiro e ao programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, pelo desenvolvimento do curso de mestrado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4.ed. Carol Stream, Illinois-USA: Allured Publishing Corporation, 804p, 2007.
- ANTUNES, M.D.C.; CAVACO, A. M. The use of essential oils for postharvest decay control. A review. **Flavour and Fragrance Journal**, v.25, p. 351-366, 2010.
- BOWERS M. D. Iridoid glycosoids and host plant specificity in larvae of the buckeye butterfly *Junonia coenia*. **Journal of Chemical Ecology**. v10, n11, p.1567–78, **1984**
- CARVALHO Z. S. **Lippia alba (Mill) N.E. Brown: CARACTERIZAÇÃO E POTENCIAL FITOQUÍMICO**. 2017. 97 f. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas-Ba, 2017.
- CAMÊLO, L. C. A. **Caracterização de germoplasma e sazonalidade em erva cidreira-brasileira [*Lippia alba* (Mill.) N. E. Br.]**. 80 p. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas). Universidade Federal de Sergipe. São Cristóvão – Sergipe, 2010.
- CRUZ, E. M. DE O. et al. Acaricidal activity of *Lippia gracilis* essential oil and its major constituents on the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**, v.195, n. (1/2), p. 198-202, 2013
- DANTAS T. L. et al, Estudo etnofarmacológico de plantas medicinais: atividade antimicrobiana de extratos de *Allium sativum* L. (alho) e *Bixa orellana* L. (urucum). **Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management**, v. 14., n. 1, jan/mar 2018

ESCOBAR, P. et al., E. Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian *Lippia* spp essential oils and their major components. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 6, p. 184-190, 2010.

FERNANDES B. F. et al, estudo etnofarmacológico das plantas medicinais com presença de saponinas e sua importância medicinal. **SAJES – Revista da Saúde da AJES**, Juína/MT, v. 5, n. 9, p. 16 – 22, Jan/Jun. 2019.

GENNARO, A. R. **Remington: the science and practice of Pharmacy**. 19. ed, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1995.

GUIMARÃES, L. G.L. et al. Óleo essencial de *Lippia sidoides* nativas de minas gerais: Composição, estruturas secretoras e atividade antibacteriana. **Revista Ciencia Agrônômica**, v.45, n. 2, p. 267-275, 2014.

HARMAN, G.E. et al. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**. v. 2, p.43-56, 2004.

INMET - Instituto Nacional de Meteorologia. Banco de Dados Meteorológicos para Ensino e Pesquisa, 2018, Disponível em: [Andlt;http://www.inmet.gov.br/portal/Andgt;](http://www.inmet.gov.br/portal/Andgt;). Acesso em 01/06/2019

JANNUZZI, H. et al., Avaliação agrônômica e identificação de quimiotipos de erva cidreira no Distrito Federal. **Horticultura Brasileira**, v.28, p. 412-417. 2010.

JOULAIN, D.; KÖNIG, W.A. **The atlas of spectral data of sesquiterpene hydrocarbons**. Hamburg-Germany: EB-Verlag, 658p, 1998.

MASCARENHAS M. S. ***Trichoderma* sp. e subprodutos agrícolas no controle do mal do Panamá**. DISSERTAÇÃO, (Mestrado em Microbiologia Agrícola), 83p. - UFRB, Cruz das Almas-BA, 2016.

MELO, J.O.DE. et al. Antidermatophytic and antileishmanial activities of essential oils from *Lippia gracilis* Schauer genotypes. **Acta Tropica**, v. 128, p. 110-115, 2013

MENDES, S.S. et al. Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Lippia gracilis* leaves, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 129, p. 391-397, 2010

MOREIRA F. J. C. et al. Alternative control of root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) race 2 with essential oils in soil. **Summa phytopathol**. V.41, N.3 Botucatu July/Sept. 2015

LEANDRO, L. F. S. et al., Population dynamics of *Trichoderma* in fumigated and compost-amended soil and on strawberry roots. **Applied Soil Ecology**, v. 35, p.237-246, 2007.

- MATTOS, S.H. **Estudos fitotécnicos da *Mentha arvensis* L. var. *piperacens* Holmes como produtora de mentol no Ceará.** Tese (Doutorado -Fitotecnia), 98p. - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2000.
- NASCIMENTO, P. F. C. et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 108-113, 2007.
- NOGUEIRA, M. A. et al., Caracterização química e atividade biológica do óleo essencial de *Lippia alba* cultivada no Paraná. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 3, p. 273 - 278, 2007.
- OOTANI, M.A. et al. Use of essential oils in agriculture. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 4, n. 2, p. 162-174, 2013.
- OLIVEIRA, D. R. et al., Ethnopharmacological study of two *Lippia* species from Oriximiná, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 108, p. 103–108, 2006
- PEIXINHO G. S. et al., Control of dry rot (*Lasiodiplodia theobromae*) in bunches of grapevine cv. Itália using essential oil and chitosan. **Summa phytopathol.** V.43, N.1 Botucatu Jan./Mar. 2017
- RUSSO, M. et al. Essential oil chemical composition and antifungal effects on *Sclerotium cepivorum* of *Thymus capitatus* wild populations from Calabria, southern Italy. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 2, p. 239-248, 2013
- SANTOS, M. R. A. et al., Efeitos da altura de corte de erva-cidreira (*Lippia alba*) na produção de biomassa e óleo essencial. 13 p. Boletim de pesquisa e desenvolvimento/ EMBRAPA. Rondônia, v,35. 2006.
- SBRAVATTI JUNIOR, J.A. et al., Seleção in vitro de fungos endofíticos para o controle biológico de *Botrytis cinerea* em *Eucalyptus benthamii*. **Floresta**, Curitiba, PR, v. 43, n. 1, p. 145-152, jan./mar. 2013.
- SINGH S. et al., Evaluating the potential of combined inoculation of *Trichoderma harzianum* and *Brevibacterium halotolerans* for increased growth and oil yield in *Mentha arvensis* under greenhouse and field conditions. **Industrial Crops and Products**, v.131, p.173–181, 2019.
- TELES S. **Avaliação do teor e da composição química das folhas de *Lippia alba* (Mill) n.e.br. e *mentha piperita* l. cultivadas em Cruz das Almas, Santo Antônio de Jesus e Amargosa, submetidas às diferentes épocas de colheita e processos de secagem.** DISSERTAÇÃO, (Mestrado em Ciências Agrárias) - UFRB, Cruz das Almas-BA, 2010.
- TOMOZONI E. Z. et al. In vitro antifungal activity of four chemotypes of *Lippia alba* (Verbenaceae) essential oils against *Alternaria solani* (Pleosporaceae)

isolates. **Anais da Academia Brasileira de Ciências** v.88, n.2 Rio de Janeiro, 2016

SANTOS, A.S. et al. **Descrição de Sistema e de Métodos de Extração de Óleos Essenciais e Determinação de Umidade de Biomassa em Laboratório**. EMBRAPA, 2004. (Comunicado Técnico)

TAVECHIO, W. L. G. et al., Alternativas para a prevenção e controle de patógenos na piscicultura. **Boletim do Instituto de Pesca** , [SI], v. 35, n. 2, p. 335 - 341, nov. 2018.