



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE CIÊNCIA E TECNONOLOGIA AGROALIMENTAR  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
AGROINDUSRIAIS**

**EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Melaleuca alternifolia* NO  
CONTROLE DE *Lasiodiplodia theobromae* EM SEMENTES DE MILHO**

**POMBAL - PB  
2019**

**IONALY GOMES DE ARAÚJO**

**EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Melaleuca alternifolia* NO  
CONTROLE DE *Lasiodiplodia theobromae* EM SEMENTES DE MILHO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sistemas Agroindustriais, na Universidade Federal de Campina Grande, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Sistemas Agroindustriais. Linha de Pesquisa: Produção e Tecnologia Agroindustrial.

**Orientador:**

Prof. Dr. Tiago Augusto Lima Cardoso

**POMBAL – PB  
2019**

A663e Araújo, Ionalys Gomes de.  
Efeito do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* no controle de  
*Lasiodiplodia theobromae* em sementes de milho / Ionalys Gomes de  
Araújo. – Pombal, 2019.  
45 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Sistemas Agroindustriais) – Universidade  
Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia  
Agroalimentar, 2019.

"Orientação: Prof. Dr. Tiago Augusto Lima Cardoso".  
Referências.

1. Antifúngico. 2. Fungos fitopatogênicos - Controle alternativo. 3.  
Podridão negra. 4. *Zea mays*. I. Cardoso, Tiago Augusto Lima. II. Título.

CDU 632.952 (043)



Centro de Ciências e Tecnologia Agroalimentar



CAMPUS DE POMBAL

**“EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Melaleuca alternifolia* NO CONTROLE DE *Lasiodiplodia theobromae* EM SEMENTES DE MILHO”**

Defesa de Trabalho Final de Mestrado  
Apresentada ao Curso de Pós-  
Graduação em Sistemas Agroindustri-  
ais do Centro de Ciências e Tecnologia  
Agroalimentar da Universidade Federal  
de Campina Grande, Campus Pombal-  
PB, em cumprimento às exigências pa-  
ra obtenção do Título de Mestre (M.  
Sc.) em Sistemas Agroindustriais.

Aprovada em 05 / 04 / 2019

COMISSÃO EXAMINADORA

Tiago Augusto Lima Cardoso  
Orientador

Antônio Francisco de Mendonça Júnior  
Examinador Interno

Ana Paula Medeiros dos Santos Rodrigues  
Examinadora Externa

POMBAL-PB  
2019

CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA AGROALIMENTAR

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SISTEMAS AGROINDUSTRIAIS

RUA: JAIRO VIEIRA FEITOSA, 1770 - CEP.: 58840-000 - POMBAL - PB

SECRETARIA DO PPGSA: 3431-4016 COORDENAÇÃO DO PPGSA: 3431-4069

## **DEDICATÓRIA**

A Deus, meu Senhor e Salvador, a ele toda honra e toda glória pelas bênçãos em minha vida e pela alegria de viver em tua presença.

Aos meus pais, ao meu esposo e a todos que sempre estiveram ao meu lado, como forma de gratidão pelos exemplos de amor, compreensão, dedicação e companheirismo os quais me foram dedicados para que eu pudesse alcançar este objetivo.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus, que me guiou em todos os momentos da vida, me dando coragem para enfrentar todos os obstáculos encontrados.

À minha mãe, fonte de inspiração, respeito e exemplo de mulher, que sempre acreditou em mim, dizendo que sou capaz de realizar todos os sonhos que eu planejo.

Ao meu pai, pelo amor, carinho e responsabilidade quanto à minha formação, sempre orgulhoso de minha capacidade.

Aos meus irmãos, meus cunhados e meu sobrinho, por sempre acreditarem em mim, oferecendo apoio nos momentos mais difíceis.

Ao meu esposo Gerson Galvão, que esteve ao meu lado nos momentos difíceis, acreditando na minha capacidade, com amor e apoio no período de realização deste trabalho.

Ao professor Tiago Augusto Lima Cardoso, por ter aceitado o desafio do meu tema e orientá-lo, por sua dedicação, disponibilidade e amizade durante todo esse período, no qual nunca mediu esforços para ajudar-me. Obrigada pelos ensinamentos, atenção, confiança e apoio ao longo desta pesquisa.

Ao professor Antônio Francisco de Mendonça Junior, pela excelente contribuição aos meus estudos, pela amizade, paciência, dedicação, confiança e por não medir esforços para que eu chegasse até aqui.

À professora Ana Paula Medeiros dos Santos Rodrigues, por sua importante contribuição para a minha pesquisa, por toda a compreensão e os ensinamentos oferecidos.

A todos os familiares e amigos que se fizeram presentes em minha vida, sempre me incentivando.

Ao professor Fernandes Antônio de Almeida, por ceder o laboratório de fitopatologia para que pudéssemos realizar esta e outras pesquisas.

Aos colegas mestrando que, direta ou indiretamente, colaboraram com a realização deste trabalho.

## RESUMO

O fungo *Lasiodiplodia theobromae* ocasiona a podridão negra em sementes de milho, sendo responsável por prejuízos na cadeia produtiva desse cereal. Devido à escassez de produtos naturais pouco prejudiciais que possam atuar no controle de agentes fitopatogênicos, pesquisas visando à utilização de técnicas alternativas de controle e manejo de doenças de plantas têm se intensificado. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito do óleo essencial de melaleuca *in vitro* e em *in vivo*. O experimento *in vitro* foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com seis tratamentos: o óleo melaleuca nas doses 0,25, 0,50, 0,75 e 1,0%, uma testemunha negativa e uma testemunha positiva (250  $\mu\text{L L}^{-1}$  do fungicida Thiram). O experimento *in vivo* testou o óleo essencial no controle de *L. theobromae* em sementes de milho. Nesse teste, as concentrações do óleo essencial foram selecionadas conforme a sua eficiência no teste *in vitro* e foram utilizadas as concentrações superior e inferior à dose encontrada no experimento *in vitro*, além do uso do fungicida sintético para o fungo *L. theobromae*. No teste *in vitro*, os resultados demonstraram que a partir da concentração de 0,75% o óleo essencial de melaleuca apresentou 100% de inibição sobre o crescimento micelial de *L. theobromae*. O óleo de melaleuca demonstrou inibição crescente sobre os micélios dos fungos avaliados com o aumento das concentrações desse óleo essencial. Observou-se que o óleo de melaleuca apresentou efeito inibitório significativo sobre o desenvolvimento micelial *in vivo* do fungo *L. theobromae* e na dose de 1,0% obteve um percentual de inibição superior ao fungicida padrão do mercado. De forma geral, o óleo proporcionou alta inibição no desenvolvimento do fungo estudado, sendo, portanto, um promissor agente de controle contra esse patógeno.

**Palavras-chave:** Atividade antimicrobiana, crescimento micelial, podridão negra, *Zea mays*.

## ABSTRACT

The fungus *Lasiodiplodia theobromae* causes black rot in maize seeds, leading to significant losses in the production of this cereal. Due to the scarcity of non-harmful natural products that can act in the control of phytopathogens, surveys aiming to find alternative techniques of control and management of plant diseases have increased. This work evaluates the effect of melaleuca essential oil on the mycelial growth of the fungus *L. theobromae*. We performed *in vitro* and *in vivo* experiments. The *in vitro* experiment was a completely randomized design with six treatments: Melaleuca oil at doses of 0.25, 0.50, 0.75, and 1.0%, one negative control, and one positive control (250  $\mu\text{L L}^{-1}$  of Thiram fungicide). The *in vivo* experiment tested the effect of essential oil on *L. theobromae* incidence in corn seeds. The chose of oil concentrations for *in vivo* tests followed the results of the previous *in vitro* test and the immediate superior and inferior concentrations. We also compared the efficacy of oil and synthetic fungicide. The concentrations of oil above 0.75% inhibited 100% of *L. theobromae* growth. The inhibition of mycelia growth increased with concentrations. The oil reduced the fungal incidence on maize seeds but was unable to inhibit 100% the fungal colonies. In general, the oil showed high inhibition on the growth of the studied fungus. Therefore, it is a promising control agent against *L. theobromae*.

**Keywords:** Antimicrobial activity, mycelial growth, black rot, *Zea mays*.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** **A.** Efeito de diferentes concentrações do óleo essencial de melaleuca e do fungicida Vitavax-Thiram sobre a porcentagem de inibição do crescimento micelial de *Lasiodiplodia theobromae*. **B.** Efeito das concentrações do óleo melaleuca e do fungicida Vitavax-Thiram sobre o Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (cm dia-1) do fungo *L. theobromae*.....24
- Figura 2.** Efeito de diferentes concentrações do óleo essencial de melaleuca sobre a porcentagem de inibição do crescimento micelial de *Lasiodiplodia theobromae*.....25
- Figura 3.** Incidência de *Lasiodiplodia theobromae* em sementes de milho, submetidas aos tratamentos com óleo essencial de melaleuca.. .....27
- Figura 4.** Porcentagem da incidência de colônias de *L. theobromae* em diferentes concentrações do óleo essencial de melaleuca e nos tratamentos testemunha (positiva e negativa) em sementes de milho híbrido AG1051..... 29

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>10</b>
<b>2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>13</b>
2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O MILHO.....	13
2.2 O FUNGO <i>Lasiodiplodia theobromae</i> (Pat.) Griffon & Maubl.....	14
2.3 PODRIDÃO NEGRA CAUSADA POR <i>Lasiodiplodia theobromae</i> NA CULTURA DO MILHO .....	14
2.4 A UTILIZAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS NO CONTROLE DE MICRORGANISMOS.....	17
2.5 O ÓLEO <i>Melaleuca alternifolia</i> NO CONTROLE DE FITOPATÓGENOS.....	19
2.6 A TOXICIDADE DO ÓLEO <i>Melaleuca alternifolia</i> .....	20
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>21</b>
3.1 LOCAL DE ESTUDO E AQUISIÇÃO DA CEPA MICROBIANA... ..	21
3.2 TESTE <i>in vitro</i> .....	21
3.3 TESTE <i>in vivo</i> .....	22
3.4 ANÁLISE DOS DADOS .....	23
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>24</b>
4.1 EFEITO <i>IN VITRO</i> DE ÓLEO ESSENCIAL DE <i>MELALEUCA ALTERNIFÓLIA</i> NO DESENVOLVIMENTO DO FUNGO <i>L. theobromae</i> . .....	Erro! Indicador não definido.
4.2 TRATAMENTO DE SEMENTES DE MILHO INFECTADAS POR <i>L. theobromae</i> COM ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Melaleuca alternifolia</i> .....	27
4.3 COMPARAÇÃO COM FUNGICIDA COMERCIAL EM SEMENTES DE MILHO.....	29
<b>5 CONCLUSÃO.....</b>	<b>30</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>31</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o terceiro maior produtor de milho (*Zea mays* L.) no mundo, perdendo apenas para os Estados Unidos e a China. A safra 2016/2017 atingiu uma área cultivada de 17,6 milhões de hectares (USDA, 2017). O somatório da produtividade da primeira e da segunda safra nacional atingiu 97,8 milhões de toneladas e obteve uma média de produção de 5,6 toneladas por hectares para ambas as safras (CONAB, 2018).

O cultivo do milho compreende um dos mais relevantes segmentos econômicos do agronegócio nacional. As regiões Sul, Centro-Oeste e Sudeste apresentaram maiores áreas de produção e os estados de Paraná, Mato Grosso, Minas Gerais, Bahia e Pará se destacaram por serem os maiores produtores desse grão (CONAB, 2017).

Apesar do sucesso da cultura nos últimos anos, o milho tem manifestado certa susceptibilidade à incidência de patógenos, sendo os fungos os microrganismos que promovem as perdas mais severas na produção (BARBOZA, 2015; FANCELLI; DOURADO NETO, 2008). As perdas de grãos no Brasil correspondem a aproximadamente 10% da colheita, sendo resultantes de fatores incontroláveis, como clima e doenças. Já as perdas durante a colheita têm ocorrido em função de erros sistemáticos de regulagem de máquinas ou de limitações próprias da colheita manual. Na fase de pós-colheita, as perdas ocorrem devido ao armazenamento incorreto, ocasionando danos na quantidade e na qualidade dos produtos estocados. Também a escolha do tipo de transporte tem favorecido para aumentar esses desperdícios. (IBGE, 2005).

As sementes de milho são vulneráveis a inúmeras espécies de fungos as quais ocasionam prejuízos para o estabelecimento da planta, diminuição do estande e enfraquecimento das plântulas. Portanto, a ocorrência de patologias nessa cultura interfere em produção, qualidade, palatabilidade e valor nutricional dos grãos (PINTO, 1998; WORDELL FILHO; CASA, 2010).

As doenças presentes em sementes são responsáveis por diversos prejuízos na cadeia produtiva do milho. Pesquisas feitas em amostras provenientes de áreas de cultivo no estado da Bahia mostraram que o fungo *Lasiodiplodia theobromae* tem ocasionado danos em diversos hospedeiros. Dentre as espécies infectadas por este patógeno, destacou-se o milho (OLIVEIRA et al., 2012).

O fungo *Lasiodiplodia theobromae* causa a podridão negra dos grãos de milho. A sintomatologia típica dessa enfermidade é caracterizada pela descoloração puntiforme em todos os grãos no topo das espigas, em seguida estes apresentam uma coloração marrom e, nos estágios mais avançados, tornam-se pretos, acompanhados de uma podridão seca (EMBRAPA, 1980; MA et al, 2016).

Tradicionalmente, o controle dessa enfermidade é feito com fungicidas comerciais à base de Carboxanilida (Carboxina), Dimetilditiocarbamato (Tiram) e Etilenoglicol, mas a utilização desses agrotóxicos a longo prazo gera impactos negativos para a saúde humana e ao meio ambiente devido a toxicidade e poluição causadas pelos resíduos químicos, desequilíbrio ecológico ocasionado pela falta de especificidade desses produtos, bem como da contaminação de reservatórios hídricos, alimentos e produções orgânicas. Além disso, a necessidade de novos agentes de controle se acentua ao longo do tempo, em decorrência da seleção e da multiplicação dos microrganismos resistentes a esses compostos (MAPA, 2009; SILVA et al., 2013; ARAÚJO et al., 2017; MIRANDA et al., 2017).

O desenvolvimento de uma consciência ecológica por parte dos consumidores e o cuidado com a conservação ambiental por parte dos órgãos governamentais de controle têm motivado a busca por produtos naturais menos prejudiciais que possam atuar no controle de agentes fitopatogênicos. Pesquisas visando à utilização de técnicas alternativas de controle e manejo de doenças de plantas têm se intensificado, como por exemplo, o uso de fungicidas de origem vegetal, entre os quais destacam-se os óleos essenciais, que são produzidos a partir metabólitos secundários de plantas (VENTUROSOSO et al., 2011a; VENTUROSOSO et al., 2011b; ARAÚJO; COSTA, 2013).

O emprego dos óleos essenciais tem se mostrado uma opção acessível para a substituição ou suplementação dos tratamentos químicos tradicionais, pois além de vários deles apresentarem baixa toxicidade aos seres humanos (NARDELLI et al., 2009; VIGAN, 2010), também vêm demonstrando eficiente controle *in vitro* e *in vivo* de fitopatógenos e no tratamento de sementes (MÉDICE et al., 2007; PEREIRA et al., 2008; RODRIGUES et al., 2006; SILVA; BASTOS, 2007).

O óleo essencial de melaleuca (*Melaleuca alternifolia*), devido à presença do composto terpinen-4-ol em sua composição, apresenta propriedades antifúngicas, bactericidas, antiviral, anti-inflamatórias, anestésicas, analgésicas, anti-neoplásicas, inseticidas e antiparasitárias. A atividade antimicrobiana dessa substância foi relatada em vários estudos referentes à medicina

tradicional e no controle de fitopatógenos (LIS-BALCHIN et al., 2000; HAMMER et al., 2003; CALDEFIE-CHEZET et al., 2006; BALDISSERA et al., 2014; SOUZA et al., 2015).

A classificação toxicológica para as substâncias ativas no óleo de melaleuca ainda não foi determinada pela Anvisa (ANVISA, 2016), porém algumas pesquisas observaram que este óleo apresenta baixa toxicidade em seres humanos e em outros mamíferos (MIKUS et al., 2000; SOUZA, FERNANDES, 2006; NARDELLI et al., 2009; VIGAN, 2010 ). No entanto, estudos feitos pelo Comitê Australiano de Padronização de Componentes Químicos estabeleceu que o óleo deve conter quantidades de cienol abaixo de 15%, pois esta substância é irritante para a pele, e de terpenen-4-ol acima de 30%, para que o mesmo tenha eficácia mínima como antimicrobiano (SIMÕES, 2002).

Dessa forma, o presente trabalho tem por objetivo avaliar o efeito do óleo de melaleuca em várias concentrações sobre o desenvolvimento do fungo *L. theobromae* *in vitro* e *in vivo*. Os resultados deste estudo servirão de suporte a novas pesquisas relacionadas à aplicabilidade desse óleo para o desenvolvimento de tecnologias, no sentido de controlar as diversas patologias fúngicas nessa cultura, o que poderá reduzir os riscos toxicológicos e melhorar a sustentabilidade da produção, minimizando as perdas de sementes durante manejo, armazenamento e comercialização.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O MILHO

O milho (*Zea mays* L.) é uma gramínea pertencente à família Poaceae presente em grande parte das atividades relacionadas à agricultura e à pecuária. Devido a sua versatilidade de utilização, o milho tem uma grande importância à atividade agrícola brasileira (MAGALHÃES; SOUZA, 2013).

De acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento (2017), o Brasil apresentou uma produção de aproximadamente 87.408, 5 mil toneladas de milho, conforme levantamento feito em janeiro de 2017. Os Estados Unidos são o principal produtor mundial, com uma produção anual estimada de 384 milhões de toneladas, e a China, o segundo maior produtor, com produtividade de 103,6 milhões de toneladas desse grão.

No Nordeste brasileiro, a crescente demanda do setor da indústria e do comércio por grãos de milho tornou essa cultivar uma boa opção para a economia de diversos sistemas de cultivos locais, presentes em diversas áreas do cerrado, sertão e agreste. A grande maioria do milho cultivado nessa região é variedade híbrida, porém, ainda existe a presença de produtores que plantam as variedades crioulas, de valor sociocultural imensurável (CARVALHO et al., 2009).

A plantação do milho na Paraíba ocorre no início do ano, mas o estado é importador desse grão, pois o cultivo não é suficiente para atender ao consumo local. Nesse estado, a área plantada do grão vem diminuindo em decorrência das severas condições climáticas nas cinco últimas safras, com inúmeros danos na produtividade. Na safra 2016/2017 foram plantados 86,5 mil hectares que, devido à restrição hídrica, apresentou produtividade de apenas 446 kg/ha. Na safra 2017/2018, a melhoria dos regimes chuvosos elevou a expectativa de plantio para 109 mil hectares e a produtividade para 875 kg/ha (CONAB, 2018).

As principais sementes de milho cultivadas no estado Paraíba são as variedades crioulas e híbridas. As variedades crioulas podem ser reaproveitadas por diversas gerações e em safras consecutivas, sendo relevantes para a agricultura ecológica e orgânica, além de favorecer a criação das próprias sementes pelo agricultor e com menor utilização de fontes externas. Essas variedades são tolerantes às condições edafoclimáticas locais, permitindo a autonomia dos produtores (TRINDADE, 2006; CRUZ et al., 2012).

Dentre os híbridos mais cultivados na Paraíba, observa-se que os híbridos AG 1051 e BR 2010 e a variedade BRS Sertanejo podem ser recomendados para aumentar a produção familiar de milho. A maioria desses híbridos apresenta elevado vigor e produção na primeira geração, porém, diminuem o vigor na segunda geração, tendo como características, ciclo reduzido, porte baixo e menor quantidade de folhas, com resposta positiva ao aumento da densidade de plantas em virtude do aumento da interceptação da radiação solar (SANTOS et al., 2009; KVITSCHAL et al., 2010; CRUZ et al., 2012).

O híbrido de milho AG 1051 apresenta várias características agronômicas, dentre as quais destacamos: ciclo semiprecoce, alta qualidade de colmo, porte elevado, grandes potenciais de produção e de geração de matéria seca e proteína. Esse híbrido é indicado para silagem devido à elevada produção de massa verde com alta digestibilidade. Portanto, lidera o mercado de milho verde e pamonha, por causa da uniformidade de maturação e ótima aceitabilidade pelos consumidores, sendo plantado e comercializado em praticamente todas as regiões do País (CARVALHO et al., 2000).

A composição química dessas variedades de milho varia conforme o tipo de semente, solo, adubação e condições climáticas. Os principais constituintes químicos do milho são os carboidratos (amido) e lipídeos (óleo), o que o faz ser considerado um alimento energético tanto para alimentação humana quanto para dieta animal. A proteína presente nesse grão, embora em quantidade significativa, possui qualidade inferior à de outras fontes vegetais e animais (MCKEVITH, 2004).

## 2.2 O FUNGO *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl

O fungo *Lasiodiplodia theobromae* pertence à família Botryosphaeriaceae, ordem dos Botryosphaerales e classe dos Dothideomycetes. Existem 19 sinônimos para *Botryodiplodia theobromae* (Pat.), incluindo *Diplodia gossypina* Cooke e na fase sexuada o referido fungo foi nomeado como *Physalospora rhodina* Berk e Curt. Apud. Cooke. Esse fitopatógeno desenvolve-se nas regiões tropicais e subtropicais, onde causa diversos danos a inúmeras espécies vegetais cultivadas, estando presente em solos argilosos ou subsolo impermeável com umidade alta e em temperaturas entre 12 e 25 °C (PUNITHALINGAM, 1976; GALET, 1977).

As colônias de *L. theobromae* apresentam coloração acinzentada à negra em meio de cultura Ágar Batata Dextrose (BDA), com numerosos micélios aéreos, e ao reverso da cultura em placa de Petri são foscas ou negras. Desenvolvem picnídios simples ou compostos

submergidos em um estroma com até 5 mm de largura, agregados, ostiolados, subovóides para elipsoides oblongos, com parede espessa e base truncada. As paráfises, quando presentes, são hialinas, esféricas, septadas, tendo um comprimento superior a 50 µm. Os conídios são hialinos, simples, cilíndricos a subperiformes, sendo inicialmente asseptados, subovóides e elipsoides e ao amadurecer tornam-se uniseptados e de coloração castanho-amarelados, e longitudinalmente estriados com dimensões que variam entre 18-30 x 10-15 µm. (ENCINAS, 1996).

Em folhas, caules e frutos de plantas infectadas por esse fungo, os picnídios são imersos, tornando-se erumpentes, mostrando-se de forma isolada ou agrupada, apresentando 2 a 4 mm de largura, sendo ostiolados e frequentemente pilosos, e podem ter protrusões de conídios com aparência de uma massa enegrecida (NUNES et al., 2008).

Esse fitopatógeno é polífago e se manifesta em mais de 500 espécies de plantas, sendo considerado um sério problema para a agricultura brasileira, já que ocasiona doenças em inúmeras plantas cultivadas e, dessa forma, causa perdas significativas na produção, notadamente no Nordeste brasileiro (FREIRE et al., 2004; PEREIRA; SILVA; RIBEIRO, 2006).

Na Bahia, o fungo *L. theobromae* vem causando a morte de mangueiras, cajaraneiras e cajueiros, tendo sido identificado no período de 2009 a 2012, por meio de exames realizados no Laboratório de Fitopatologia da Central de Laboratórios da Agropecuária da EBDA (FITO/CLA/EBDA), em outras frutíferas, como abacateiro, coqueiro, citros, frutos de graviola, jambeiro, pinha, jenipapo, e nas ornamentais: flamboyant, barba-de-barata, faveiro, cássia-amarela, *ficus benjamina*, palmeira imperial e sombreiro. Esse fitopatógeno foi também encontrado na palma forrageira e em sementes de mamona e de milho (OLIVEIRA et al., 2012; OLIVEIRA et al, 2013).

Dentre as principais doenças ocasionadas por esse fungo podemos destacar: morte descendente, murcha, podridão basal de frutos, seca-descendente (dieback), cancro em ramos, caules, raízes, lesões em estacas, folhas, frutos e sementes, além da morte de mudas e enxertos. Sua capacidade de contaminar frutos o coloca entre os mais eficientes patógenos propagados por sementes e causadores de problemas após a colheita (FREIRE et al., 2004; PEREIRA; SILVA; RIBEIRO, 2006).

A ocorrência de *L. theobromae* de forma endofítica, sem gerar danos, foi descrita em inúmeros hospedeiros: *Eucalyptus*, *Acacia*, *Pinus* e *Theobroma cacao* L. Pesquisas relataram também algumas atividades biológicas importantes para tal fungo. No ano de 2012, foi descrito que o extrato de *L. theobromae*, isolado de *Piper hispidum* Sw., apresentou significativa ação

antibacteriana contra *Enterococcus hirae*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus* e *Staphylococcus aureus* (CARDOSO, 2009; BAIRD; CARLING, 1998; CILLIERS, 1993; MOHALI; BURGESS; WINGFIELD, 2005; MULLEN; AL, 1991; RUBINI; AL, 2005; ORLANDELLI et al., 2012).

### 2.3 PODRIDÃO NEGRA CAUSADA POR *Lasiodiplodia theobromae* NA CULTURA DO MILHO

A produtividade do milho é influenciada, entre outros fatores, pela ocorrência de doenças que causam manchas foliares e podridões do colmo e da espiga. As podridões de espigas são causadas por várias espécies de fungos que geram danos consideráveis na produção e na qualidade dos grãos colhidos, reduzindo do valor nutricional do cereal (MARCONDES, 2013).

No milho, os fungos adentram as sementes e atingem o embrião e o endosperma e, dessa forma, provocam a podridão de sementes, raízes, colmo e espigas, comprometendo a palatabilidade, a germinação e uma maior produção de grãos ardidos (SACHS, et al 2012).

O fungo *Lasiodiplodia theobromae* causa a podridão negra dos grãos. A sintomatologia típica dessa enfermidade é caracterizada pela descoloração puntiforme em todos os grãos de milho no topo das espigas e em seguida as sementes tornam-se enegrecidas, mofadas e fissuram, exibindo o endosperma. Elas passam a apresentar uma coloração cinza-preta à medida que a infecção se agrava, devido à elevação da umidade relativa do ar. A superfície da infecção torna-se coberta por uma camada de micélios de coloração cinza, na qual são formados estromas e picnídios. O patógeno também pode infectar diretamente a bráctea (MA et al., 2016).

Estudos realizados nas áreas de produção revelaram que *L. theobromae* causa cancos em uma ampla gama de hospedeiros, como frutas e hortaliças, e também foi descrito atacando o milho no Brasil, na Índia, em Cuba e na China (ALVES et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2012).

Esse fitopatógeno é identificado, na maioria das vezes, propagando-se nos tecidos internos das sementes e a sua dispersão ocorre em todo o continente americano. No Brasil, o *Lasiodiplodia sp.* está relacionado a agravos em frutíferas, como *Mangifera indica*, *Malpighia marginata*, *Cocos nucifera*, *Persea americana*, *Annona muricata*, *Spondias tuberosa*, *Carica papaya* e *Carya illinoensis* (SHAHBAZ et al., 2009; LIMA et al., 2012; LIMA et al., 2013; POLETTO et al., 2016).

A transmissão desse patógeno pode ser realizada pelo próprio homem, por vento, chuva e insetos que penetram nas flores e nas frutas. O fungo sobrevive em restos de culturas

contaminadas, ramos e frutas secas, sendo importantes fontes de inoculação de uma estação de cultivo para a outra. Pesquisas mostraram que o agente causal da podridão negra e seca é eficientemente transmitido pela semente e pode atingir até 19% da infecção (SANTOS et al., 2000; EMBRAPA, 2006).

## 2.4 A UTILIZAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS NO CONTROLE DE FITOPATÓGENOS

O termo óleo essencial refere-se a óleos voláteis compostos por misturas complexas de metabólitos com diversas propriedades químicas, caracterizam-se por um forte odor e podem ser extraídos de várias partes das plantas, tais como flores, folhas, ramos, frutos, sementes, raízes, caules, madeira e cascas. São denominados óleos por apresentarem-se na forma líquida na maioria das vezes, e essenciais em decorrência do aroma típico (VITTI; BRITO 2003; BAKKALI et al., 2008).

Na natureza, os compostos que formam os óleos essenciais realizam atividade fundamental na defesa das plantas, como antibacterianos, antivirais, antifúngicos e inseticidas. Esses óleos podem ser constituídos por cem ou mais compostos orgânicos, sendo os monoterpenos e sesquiterpenos são os compostos identificados com maior frequência (CASTRO et al., 2004; CASTRO et al., 2010). As características antimicrobianas deles devem-se a sua interação com lipídeos presentes na membrana da célula dos microrganismos, intervindo na sua permeabilidade e ocasionando mudanças estruturais dos mesmos (BAKKALI et al., 2008; COSTA et al., 2011). Rasooli et al. (2006) relatam que esses óleos também causam danos na parede celular e nas organelas dos fungos.

Dependendo da dosagem empregada, os óleos essenciais e seus componentes podem agir como agentes fungistáticos ou fungicidas (ANTUNES; CAVACO, 2010). O mesmo óleo pode ser eficiente contra uma ampla variedade de espécies de microrganismos, mas as concentrações mínimas inibitórias (CMI) podem variar (ZACARONI et al., 2009).

Segundo Bettioli e Morandi (2009), a utilização desses produtos de espécies aromáticas e medicinais, isolados ou em combinação com outros métodos, pode ter um importante papel no controle de fitopatógenos devido à sua potencial ação fungitóxica direta, com a inibição da germinação de esporos e do crescimento micelial, ou indireta, pela indução de produção de fitoalexinas ou outros compostos de defesa da planta.

Vários autores têm demonstrado a eficiência do uso de óleos essenciais no tratamento de sementes contra fitopatógenos como, por exemplo, Hillen et al. (2012) verificaram o efeito dos

óleos essenciais extraídos de *Eremanthus erythropappus* (candeia), *Cymbopogon martinii* (palmarosa) e de *Rosmarinus officinalis* (alecrim) no crescimento micelial de *Alternaria carthami*, *Alternaria sp.* e *Rhizoctonia solani in vitro* e sementes de milho, soja e feijão. Salustiano et al. (2006) verificaram o efeito do óleo essencial de candeia na inibição in vitro de quatro espécies de ferrugem e sob o crescimento micelial de *Cilindrocladium scoparium*. Em outro estudo realizado por Zanandrea et al. (2004) observaram que o óleo de *Origanum vulgare L.* reduziu significativamente o crescimento micelial de *Alternaria sp.*, *Bipolaris oryzae*, *Curvularia sp.* e *Rhizoctonia solani. sp.* Trabalhos realizados por Daferera et al. (2003) indicaram que in vitro o óleo essencial de alecrim reduziu 50% do crescimento micelial de *B. cinerea* e *Fusarium*, respectivamente, somente a partir de 606 e 668 mg mL<sup>-1</sup>.

Gonçalves et al. (2009) observaram que o óleo essencial de gengibre na concentração de 20% apresenta atividade positiva no controle de *Cladosporium sp*, *Rhizopus sp* e *Fusarium spp* em grãos de soja. Morais et al. (2008) realizaram o tratamento de sementes de soja utilizando os óleos essenciais de *C. citratus*, *C. flexuosus* e *Melaleuca sp.*, e reduziram a ocorrência de *Phomopsis sp.* nas sementes e o óleo essencial de *C. flexuosus* apresentou atividade inibitória sobre *Colletotrichum sp.* Viegas et al. (2005) avaliaram a toxicidade de óleos essenciais de alho e casca de canela contra os fungos do grupo *Aspergillus flavus* para o tratamento de sementes, obtendo a inibição do desenvolvimento micelial de *A. flavus* principalmente pelo óleo essencial de casca de canela. Rossi et al. (2012), estudando alguns óleos essenciais extraídos de plantas da região do Mediterrâneo, *Laurus nobilis*, *Citrus bergamia*, *Foeniculum vulgare* e *Lavandula hybrida*, demonstraram um efeito inibitório da germinação de sementes de trigo e milho.

Morais et al. (2008) avaliaram a inibição do fungo *Cladosporium sp.* pelo óleo de *Cymbopogon flexuosus* em sementes de feijão; Inácio et al. (2009) obtiveram redução do crescimento micelial de *Phomopsis phaseoli var. sojae*, *Fusarium sp.* e *Macrophomina phaseolina* em sementes de soja tratada com óleo essencial de *Melissa officinalis*, *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon winterianus* e *Cinnamomum zeylanicum*; Jardinetti et al. (2011) avaliaram o efeito de óleos essenciais na germinação de sementes de milho verificaram que as sementes submetidas aos tratamentos com hortelã e tomilho diferiram estatisticamente da Testemunha, inibindo a germinação. Por outro lado, os óleos essenciais de eucalipto, capim limão e tomilho apresentaram redução da incidência de *Fusarium sp.* e *Aspergillus spp.* na semente e plântula de milho.

Mondego et al. (2014), em trabalho com sementes de *Pseudobombax marginatum*, relatam que a concentração de 1,5% do óleo controlou eficientemente os fungos *Aspergillus sp.*, *Chaetomium sp.* e *Curvularia sp.*, sem afetar a qualidade fisiológica das sementes tratadas.

## 2.5 O ÓLEO *Melaleuca alternifolia* NO CONTROLE DE FITOPATÓGENOS

O gênero de plantas *Melaleuca*, pertencente à família Myrtaceae, inclui cerca de 200 espécies originárias da Austrália e Ilhas do Oceano Índico. A árvore melaleuca [*Melaleuca alternifolia* (Maiden & Betche) Cheel] é popularmente conhecida como “árvore-do-chá”, florescendo principalmente em regiões pantanosas localizadas perto de rios (RUSSEL; SOUTHWELL, 2002).

O óleo essencial dessa planta apresenta uma composição química bem conhecida. Seus elementos químicos têm sido citados em vários estudos, sendo rico em terpinen-4-ol, componente de importante aplicabilidade medicinal com propriedades antifúngicas e antibacterianas, o que mantém a sua comercialização há mais de 60 anos (LIS-BALCHIN et al., 2000; RUSSEL; SOUTHWELL, 2002; CABOI et al., 2002; VIEIRA et al., 2004). Além desse composto, esse óleo apresenta outros constituintes químicos importantes com propriedades antimicrobianas, tais como:  $\alpha$ -terpineno,  $\gamma$ -terpineno e 1,8-cineol. O óleo pode ser coletado das folhas, ramos e caule, tendo a sua composição documentada pela ISO 4730 (INTERNATIONAL STANDARDS ORGANISATION, 1996; MARTINS et al., 2010).

Apesar dos estudos em sua maioria serem para o controle de doenças em humanos, existem diversos estudos que demonstram as propriedades antifúngicas, antibacterianas e antivirais do óleo essencial de melaleuca sobre os seguintes patógenos, Gobatto et al. (2005) demonstraram que quanto maior a dose do óleo essencial melaleuca maior o controle *in vitro* dos patógenos *Fusarium moniliforme* e *Fusarium subglutinans*. Martins et al. (2010) observaram que esse óleo reduziu o crescimento micelial dos fungos *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Alternaria alternata* a partir da concentração de 0,2% incorporada ao meio de cultura.

Conforme Pereira et al. (2011), as doses a partir de 2000  $\mu$ L L<sup>-1</sup> do óleo essencial de melaleuca inibiram completamente a germinação de conídios de *Cercospora coffeicola* em grãos de café. De acordo com Nascimento et al. (2014), esse óleo inibiu em 87,44% o crescimento das colônias do fungo *Fusarium solani* em sementes de soja, quando comparada ao tratamento testemunha. O tratamento utilizando o óleo de melaleuca apresentou potencial de

controle do fungo *Rhizoctonia sp.*, inibindo o desenvolvimento micelial dele em 15% em comparação à testemunha (BATISTA et al., 2017).

O óleo de melaleuca apresentou controle eficiente de *Alternaria solani*, agente etiológico da pinta-preta do tomateiro, tanto em condições *in vitro* como em condições de campo (ABREU, 2006). Fialho et al. (2015) obtiveram a percentagem de inibição da germinação de esporos de *Phakopsora euvtis* em 100%, nas folhas destacadas de videira, na concentração de 4% do óleo de melaleuca.

As propriedades antifúngica, antibacteriana e antiviral contra microrganismos fitopatogênicos também já foram citadas contra *Rhizopus stolonifer* (SHAO et al., 2013), *Xanthomonas vesicatoria* (LUCAS et al., 2012) e o vírus do mosaico do tabaco (BISHOP, 1995).

## 2.6 A TOXICIDADE DO ÓLEO *Melaleuca alternifolia*

Os óleos essenciais são considerados seguros para o consumo humano em baixas concentrações (SINHA et al., 2014). No entanto, os óleos essenciais devem ser utilizados com cuidado, levando-se em consideração a dose correta, a aplicação do produto, o consumidor alvo e os principais constituintes da sua fórmula e a toxicidade (NAKATSU et al., 2000).

A classificação toxicológica para as substâncias ativas do óleo de melaleuca ainda não foi avaliada pela Anvisa (ANVISA, 2016). Experimentos realizados em ratos demonstraram que o terpenen-4-ol induziu apenas uma leve nefrotoxicidade quando administrados via dérmica, através da preparação de um gel neutro contendo 75% Carbopol, 5% Polivinilpirrolidona-iodo (PVP) e 20% de óleo de melaleuca (KREUGER et al., 2007). Outra pesquisa realizada com células sanguíneas infectadas com parasitas, demonstrou que o terpenen-4-ol é 1000 vezes mais tóxico para os parasitas do que para células humanas HL-60 (MIKUS et al., 2000; SOUZA; FERNANDES, 2006).

Conforme Vigan (2010), os componentes do óleo de melaleuca têm sido adicionados à lista de alérgenos de fragrância, pois podem ocasionar a dermatite de contato alérgica em seres humanos. Em relação à toxicidade do óleo em mamíferos, estudos indicaram que gatos e cães domésticos tratados com esse produto, para combater dermatoses, desenvolveram depressão, fraqueza e tremores musculares, tais sintomas desapareceram três dias após a interrupção do tratamento (VILLAR, et al., 1994).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 LOCAL DE ESTUDO E AQUISIÇÃO DO ISOLADO FÚNGICO

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal de Campina Grande – UFCG, no Campus de Pombal, Paraíba. A cepa de referência utilizada no estudo foi fornecida pela Coleção de Culturas de Fungos Fitopatogênicos Prof<sup>a</sup> Maria Menezes da Universidade Federal Rural de Pernambuco. O isolado utilizado foi o fungo *L. theobromae* (CMM 4534). Esse fitopatógeno foi obtido de lesões típicas em frutos. O isolado foi replicado no meio de cultivo BDA (ágar batata dextrose) e incubada na estufa a temperatura de  $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Para avaliação antifúngica *in vitro* foi utilizado o óleo essencial de melaleuca obtido da empresa Cia das Folhas (Ind. e Com. Ltda). As composições dos produtos foram informadas pela empresa por meio de laudos técnicos, tendo como principais componentes o Terpinen-4-ol (42%) e o Gammaterpinene (22%).

#### 3.2 TESTE *in vitro*

O experimento *in vitro* compreendeu seis tratamentos em cinco repetições para o fungo testado (*L. theobromae*). Os tratamentos incluíram duas testemunhas, uma positiva (meio de cultura BDA suplementado com fungicida) e outra negativa (apenas o meio de cultura,) além de mais quatro tratamentos contendo doses crescentes do óleo essencial de melaleuca. Assim, os tratamentos foram arranjados desta forma: T1 = Testemunha negativa, T2 = Testemunha positiva (250  $\mu\text{L L}^{-1}$  do fungicida Thiram), T3 = 0,25% do óleo de melaleuca, T4 = 0,50%, T5 = 0,75% e T6 = 1,00%. As concentrações estabelecidas para a aplicação do óleo em estudo foram adaptadas de Concha et al. (1998) e Martins et al. (2010), com o objetivo de testar doses semelhantes às aquelas encontradas nestas pesquisas.

Os óleos e o fungicida foram adicionados ao meio de cultura após a autoclavagem (121°C por 15 minutos) em condições assépticas. Os meios foram vertidos em placas de Petri de dimensões 75x15mm. Após a solidificação do meio, discos de 1 mm de meio de cultura

contendo o isolado fúngico cultivado por sete dias foram depositados no centro das placas. As placas foram incubadas a  $27\pm 2^{\circ}\text{C}$  para proporcionar o desenvolvimento do fungo. As medições diárias dos dois diâmetros perpendiculares foram iniciadas 24 horas após as incubações do fungo e perduraram até que uma das colônias atingisse as margens da placa. Com os dados de variação no tamanho das colônias, foram calculadas as porcentagens de inibição de crescimento micelial (PIC, BASTOS, 1997), representada pela seguinte fórmula:  $\text{PIC} = (\text{Crescimento do controle negativo} - \text{Crescimento do tratamento} / \text{Crescimento do controle negativo}) * 100$ .

O valor do índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), expresso em  $\text{cm dia}^{-1}$ , foi calculado de acordo com Oliveira (1991), pela seguinte fórmula:  $\text{IVCM} = \Sigma [(D - D_a) / N]$ , onde, D: Diâmetro médio atual,  $D_a$ : Diâmetro médio anterior, N: número de dias após a inoculação.

### 3.3 TESTE *in vivo*

Quinhentas sementes de milho híbrido AG 1051 foram desinfestadas por imersão em solução de hipoclorito de sódio a 2%, durante 5 minutos. Posteriormente, as sementes foram lavadas com água autoclavada por três vezes e secas à temperatura ambiente. O experimento *in vivo* constituiu-se de cinco tratamentos em dez repetições cada. Os tratamentos foram formulados em soluções de 100 ml de água destilada autoclavada contendo os seguintes tratamentos: T1 = Testemunha negativa (100 $\mu\text{L}$  de Tween 80), T2 = Testemunha positiva (100  $\mu\text{L}$  do fungicida Thiram e 100 $\mu\text{L}$  de Tween 80), T3, T4 e T5 = 0,5%; 0,75% e 1,00% do óleo de melaleuca e 100 $\mu\text{L}$  de Tween 80, respectivamente. Cem sementes de milho foram imersas em cada solução de tratamentos por 5 minutos, em seguida, foram secas em papel germitest à temperatura ambiente por 1 hora. As metodologias de infestação e de inoculação foram adaptadas de Ramos et al. (2014).

O fungo *L. theobromae* foi cultivado em placas contendo o meio de cultura BDA e incubado na estufa B.O.D numa temperatura de  $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ , durante 8 dias. As sementes tratadas foram contaminadas com *L. theobromae*, por meio da deposição destas sobre os micélios do fungo, de modo que todas as sementes permaneceram em contato com as estruturas fúngicas. O período de incubação das sementes sobre as colônias fúngicas foi de 32 horas. Após esse período, as sementes foram submetidas ao teste de sanidade (LIMONARD, 1966).

O teste de sanidade foi realizado pelo método de papel filtro com congelamento (LIMONARD, 1966). As 100 sementes de cada tratamento foram distribuídas em 10 placas de

Petri de 14,0 cm de diâmetro. Dez sementes foram colocadas equidistantes em cada placa, sobre duas folhas de papel filtro previamente umedecidas com água destilada esterilizada, e incubadas durante 24 horas a  $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, as placas foram transferidas para ambiente a  $-20^{\circ}\text{C}$ , durante 24 horas, e posteriormente para estufa B.O.D por mais 5 dias. As avaliações foram realizadas individualmente, examinando-se e contando-se as colônias presentes em cada semente.

### 3.4 ANÁLISE DOS DADOS

O efeito da concentração do óleo sobre o crescimento do fungo foi analisado com uso de regressões em modelo de platô quadrático para o experimento *in vitro* e em modelo quadrático para o experimento *in vivo*. As regressões foram realizadas no programa R CoreTeam 3.5.1.

Tanto para o teste *in vitro* quanto para o *in vivo* os efeitos das concentrações do óleo de melaleuca sobre as colônias de *Lasiodiplodia theobromae* foram comparados com o efeito do fungicida pelo teste de Kruskal-Wallis (ANOVA não-paramétrica) seguido do teste de Mann-Whitney (comparação múltipla não-paramétrica), admitindo-se um nível de significância de 5%. As análises foram realizadas no software Past 3.12 (HAMMER et al., 2001).

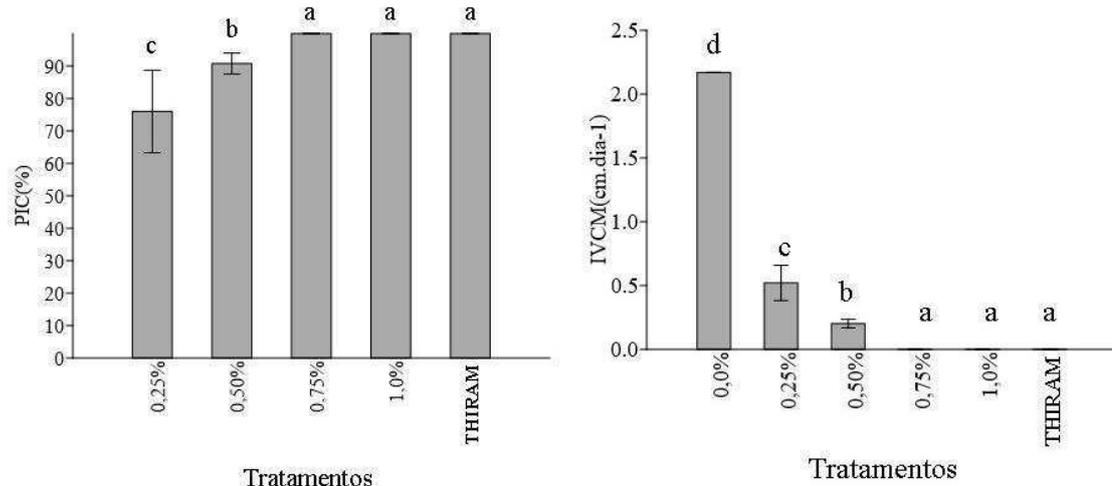
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE MELALEUCA NO CRESCIMENTO MICELIAL DE *Lasiodiplodia theobromae* IN VITRO

Todas as concentrações testadas de óleo essencial de melaleuca inibiram o crescimento micelial de *Lasiodiplodia theobromae*. As porcentagens de inibição aumentaram significativamente com as concentrações testadas até atingir o valor máximo (PIC= 100%) nas concentrações de 0,75 e 1,0% (Figura 1A). A taxa de crescimento micelial diminuiu com o aumento da concentração de óleo de melaleuca. O valor mínimo ocorreu (IVCM = 0 cm dia<sup>-1</sup>) também nas concentrações de 0,75 e 1,0%. As doses 0,0, 0,25 e 0,50 % apresentaram IVCM de 2,17, 0,52 e 0,20 cm dia<sup>-1</sup>, respectivamente (Figura 1B).

Para entender o potencial do óleo essencial de melaleuca como fungicida em *L. theobromae*, comparamos seu efeito fungitóxico com o efeito de um fungicida sintético. Encontramos um efeito de inibição semelhante do óleo essencial em relação ao fungicida na maior concentração testada (Figura 1), sugerindo que sob condições *in vitro* o fungicida sintético comercial pode ser substituído pelo óleo essencial.

**Figura 1. A.** Efeito de diferentes concentrações do óleo essencial de melaleuca e do fungicida Vitavax-Thiram sobre a porcentagem de inibição do crescimento micelial de *Lasiodiplodia theobromae*. **B.** Efeito das concentrações do óleo melaleuca e do fungicida Vitavax-Thiram sobre o Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (cm dia<sup>-1</sup>) do fungo *L. theobromae*.

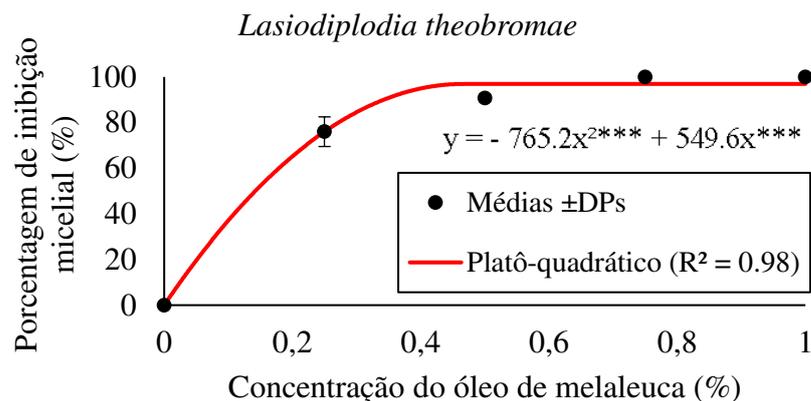


Letras minúsculas iguais na horizontal não diferem significativamente no teste de Mann-Whitney ( $p > 0,05$ ).

Segundo a literatura, o Terpinen-4-ol é o principal constituinte do óleo de melaleuca, além de outros componentes químicos, como  $\alpha$ -terpineno,  $\gamma$ -terpineno e 1,8-cineol, que contribuem para sua potente atividade antifúngica. Os mecanismos de ação do óleo essencial incluem lipidoperoxidação, inibição da biossíntese de ergosterol e aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS), que causam uma lesão primária e indução da perda da membrana, interferindo na integridade e fisiologia do microrganismo, com morte celular inerente por apoptose (COX et al., 2000; CARSON et al., 2006; KALAGATUR et al., 2018).

Observou-se que quanto maior a dose avaliada, maior o controle do patógeno, porém, atingido o valor máximo (inibição de 100%), acréscimos na concentração do óleo não aumentavam nem diminuía o valor de inibição. Por esse motivo, as inibições do crescimento micelial em função das concentrações do óleo de melaleuca foram melhores ajustadas ao modelo platô quadrático (Figura 2). Levando em consideração as concentrações do óleo utilizadas no experimento, a concentração mínima para inibição de 100% do crescimento micelial de *L. theobromae* foi de 0,75%, contudo, a análise de regressão estimou que a dose 0,47% também poderia gerar inibição de 100%.

**Figura 2.** Efeito de diferentes concentrações do óleo essencial de melaleuca sobre a porcentagem de inibição do crescimento micelial de *Lasiodiplodia theobromae*. A linha vermelha mostra a direção do efeito estimado pela análise de regressão. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ .



Esses resultados corroboram com os encontrados por Matos et al. (2018), que verificaram o potencial de inibição do crescimento micelial *in vitro* de *L. theobromae* pelo óleo de melaleuca nas concentrações de 0,4 e 0,6%, as quais proporcionaram uma inibição de 93,70 e 93,75%, respectivamente. A metodologia utilizada nesse estudo usou as concentrações menores do óleo avaliado (doses menores que 0,75%), o que provavelmente não permitiu inibir 100% o crescimento micelial do fungo em questão.

Dessa forma, as inibições causadas pelo óleo melaleuca contra *L. theobromae* diferiram das ocasionadas em outros fungos fitopatogênicos. Concha et al. (1998), testaram o óleo de melaleuca contra *Aspergillus niger* e *Penicillium sp.* e obtiveram uma atividade antimicrobiana significativa. Martins et al. (2010) observaram que o óleo reduziu o crescimento micelial dos fungos *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Alternaria alternata*, no qual tais fungos apresentaram uma sensibilidade ao óleo a partir da concentração 0,2%. Marinelli et al. (2012) verificaram que o óleo melaleuca apresentou atividade fungicida na concentração de 0,46% contra o fungo *Colletothichum gloeosporioides*, enquanto que Ramos et al. (2016) observaram a inibição total do crescimento deste fungo na concentração de 0,80%.

O óleo de melaleuca apresenta diferentes concentrações inibitórias mínimas quando utilizados contra fungos de outras espécies, e isso pode ser resultado da diversidade de mecanismos de defesa que cada espécie fúngica apresenta e da seleção e da multiplicação de fungos resistentes a esses compostos (WARDLE; PARKINSON, 1990; TAKAHASHI; MELHEM, 2014).

As doses mínimas do óleo melaleuca encontradas nessas pesquisas diferiram da concentração inibitória mínima do referido óleo para *L. theobromae* nesse estudo, sugerindo que o óleo essencial de melaleuca pode exercer diferentes atividades fungitóxicas, dependendo do microrganismo estudado, o que justifica a investigação de sua concentração inibitória

mínima em outras espécies fitopatogênicas.

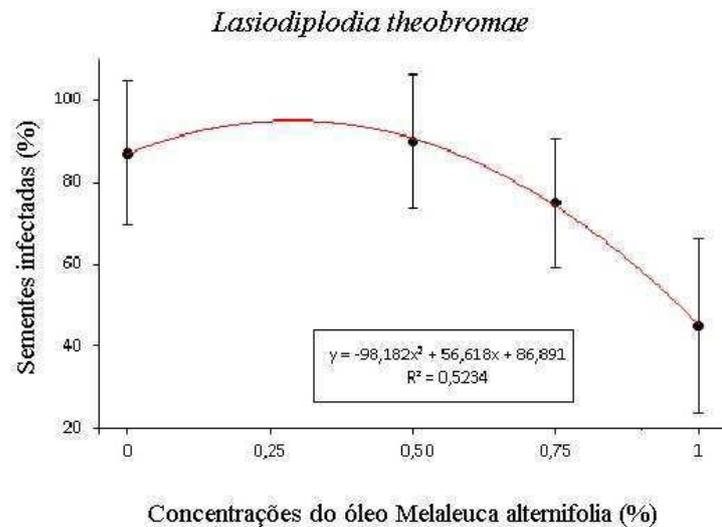
O óleo essencial de outras espécies de plantas também inibiu significativamente *L. theobromae*. Por exemplo: o óleo de menta (*Mentha arvensis*) em todas as concentrações testadas (0,25; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0%) foi capaz de inibir o crescimento micelial de *L. theobromae* em 100% *in vitro* (PEIXINHO et al., 2017a). Utilizando o óleo de citronela em todas as concentrações (1,0 e 1,5%), Peixinho et al.(2017b) encontraram uma inibição máxima de 100%, mas o óleo de cravo, testado nas mesmas concentrações, proporcionou uma inibição de 7,8 e 35,6%, respectivamente.

O controle fungitóxico promovido pelos óleos essenciais ocorre por meio do sinergismo ou antagonismo entre vários de seus componentes, que atuam por diversos mecanismos de ação em vários alvos ao mesmo tempo (HAMMER et al., 2004; D'AURIA et al., 2001; YU et al., 2015). Essas características conferem vantagens sobre o fungicida sintético, uma vez que diminuem a resistência do fitopatógeno (FENG; ZHENG, 2007).

#### 4.2 EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE MELALEUCA NO CRESCIMENTO MICELIAL DE *Lasiodiplodia theobromae* EM SEMENTES DE MILHO

As doses 0,75 e 1% do óleo essencial de melaleuca proporcionaram a redução na incidência de *L. theobromae*, diferindo daquela observada nas sementes não tratadas com óleo essencial (testemunha negativa) e do tratamento com fungicida Thiram (testemunha positiva) (Figura 3). Nenhuma das concentrações testadas erradicou completamente o patógeno. No entanto, o aumento da concentração do óleo proporcionou a diminuição da quantidade das colônias fúngicas (Figura 3). Utilizando-se a equação gerada pelo modelo polinomial quadrático, estimou-se que a dose mínima para reduzir a incidência do fungo *L. theobromae* a zero, seria de 1,26%.

**Figura 3.** Incidência de *Lasiodiplodia theobromae* em sementes de milho, submetidas aos tratamentos com óleo essencial de melaleuca.



Os resultados do presente estudo mostraram que os compostos biologicamente ativos constantes do óleo de melaleuca promoveram o efeito antifúngico significativo sobre o crescimento micelial de *L. theobromae* em condições *in vitro* e no tratamento de sementes. Ao usar o óleo na concentração de 0,75%, obtivemos inibição total do crescimento micelial em condições *in vitro*. Contudo, no tratamento de sementes, é necessária uma concentração maior para obter uma inibição significativa do fungo (<45% das sementes infectadas).

A ação do óleo de melaleuca sobre *L. theobromae* observada nos ensaios *in vivo* do presente trabalho divergiu com alguns resultados anteriormente obtidos em estudos com outros fungos fitopatogênicos. No estudo feito por Moraes et al. (2008), verificou-se uma incidência de 0% dos fungos *Aspergillus* spp. e *Phomopsis* sp., em sementes de soja tratadas com óleo melaleuca. A atividade fungicida desse óleo foi testada em sementes de pimentão, quando observou-se que nas concentrações de 0,50% e 0,75% houve 100% da inibição do crescimento do fungo *Colletotrichum gloesporioides* (NASCIMENTO, 2017). A divergência dos resultados encontrados comprova que a eficácia do óleo varia conforme as espécies dos patógenos e, dentre os fatores que interferem na eficácia de controle, o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) dos fungos pode afetar de forma significativa nos resultados (AMPONSAH et al., 2012; BESTER et al., 2007; ROLSHAUSEN et al., 2010).

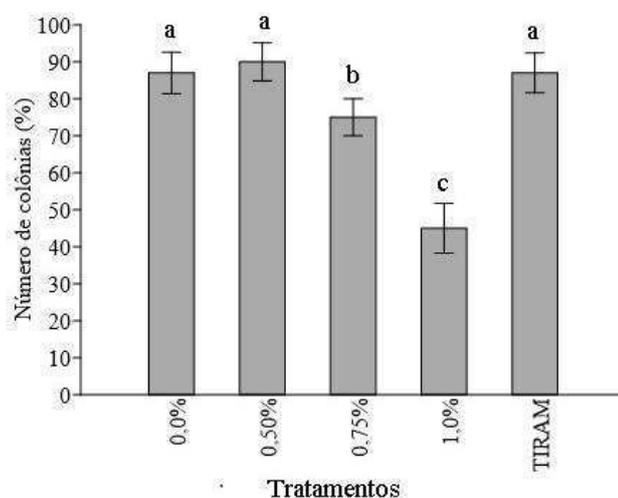
Bressan et al. (2018) estudaram o potencial fungitóxico desse óleo sobre o fungo fitopatogênico *Rhizoctonia* sp. em sementes de angico-vermelho, nas quais o óleo inibiu o desenvolvimento micelial em 15% em relação ao tratamento testemunha. A pesquisa realizada por Moraes et al. (2008) mostrou a eficiência do uso desse óleo essencial no controle de

*Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. e *Cladosporium* sp. em sementes de feijão cariocinha, obtendo uma incidência de 9,2, 11,0 e 8,5 %, respectivamente, para os fungos avaliados.

#### 4.3 COMPARAÇÃO COM FUNGICIDA COMERCIAL EM SEMENTES DE MILHO

O efeito fungitóxico do óleo essencial de melaleuca na concentração de 1,0% sobre o fungo *L. theobromae* foi superior ao obtido pelo fungicida comercial Thiram nas sementes de milho, obtendo uma incidência média de 45% em contraste com a incidência de 87% no teste com o fungicida (Figura 4). Apesar de necessitar de uma maior concentração do óleo para ter uma redução significativa nas sementes infectadas em relação ao Thiram, o uso de um produto natural e saudável pode ser uma alternativa melhor para o controle do fungo. Entretanto, concentrações mínimas recomendadas devem ser consideradas para evitar toxicidade em humanos e minimizar os impactos ambientais.

**Figura 4.** Porcentagem da incidência de colônias de *L. theobromae* em diferentes concentrações do óleo essencial de melaleuca e nos tratamentos testemunha (positiva e negativa) em sementes de milho híbrido AG1051.



As concentrações sobrescritas com a mesma letra não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Mann-Whitney ( $p > 0,05$ ).

O uso sucessivo e intensivo de fungicidas sintéticos detém o controle biológico natural, uma vez que os microrganismos não alvos podem ser afetados, gerando o aparecimento de fitopatógenos resistentes (STANGARLIN et al., 2003; LEE et al., 2008; SOYLU et al., 2010). Assim, a utilização do óleo essencial tornou-se uma alternativa viável, visto que este apresenta

substâncias com propriedades fungicidas e fungitóxicas e ocasiona menos danos à saúde humana e ao meio ambiente, quando usado em baixas concentrações. O óleo de melaleuca também é seguro para a saúde humana (ISMAN, 2000).

Sugere-se avaliar os componentes do óleo essencial de forma isolada, já que a ação dos diferentes componentes químicos presentes no óleo em alta dosagem pode ser responsável por sua atividade tóxica.

Existe uma busca crescente por produtos alternativos aos fungicidas sintéticos, em decorrência a sua alta toxicidade aos seres humanos e ao meio ambiente. Portanto, essa demanda visa alcançar diversas prioridades, como beneficiar a saúde humana, o consumo seguro dos alimentos e a sustentabilidade do meio ambiente (ABDEL-KADER et al., 2012).

Nosso estudo pode ser utilizado para a criação de defensivos agrícolas à base do óleo essencial de melaleuca e a utilização em cultivos agroecológicos, minimizando os impactos gerados pelos defensivos sintéticos. Todavia, é de suma importância o estabelecimento de dosagens seguras, respeitando o limite de toxicidade do óleo.

## 5 CONCLUSÃO

1. Foi observado efeito o inibitório no crescimento micelial de *Lasiodiplodia theobromae* frente às diferentes doses do óleo essencial de melaleuca *alternifolia* utilizadas no teste *in vitro*.
2. A dose mínima do óleo melaleuca (0,75%) apresentou uma inibição em 100% no crescimento micelial de *L. theobromae*, no teste *in vitro*.
3. O óleo mostrou-se eficiente na redução da severidade da podridão negra em sementes de milho, reduzindo significativamente a porcentagem de sementes infectadas, a partir da concentração de 1% e apresentou um efeito superior ao obtido pelo fungicida comercial Thiram.

## REFERÊNCIAS

ABDEL-KADER, M.M.; EL-MOUGY, N.S.; LASHIN, S.M. Essential oils and *Trichoderma harzianum* as an integrated control measure against faba bean root rot pathogens. **Journal of Plant Protection Research**. v.51, n.3, p.306-311, 2011.

ABREU, C.L.M. Controle de *Alternaria solani* em tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) com óleos essenciais. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 150p, 2006.

ALVES, A.; CROUS, P.W.; CORREIA, A.; PHILLIPS, A.J.L. Morphological and molecular data reveal cryptic species in *Lasiodiplodia theobromae*. **Fungal Diversity**. v.28, p.1-13, 2008.

AMPONSAH, N. T.; JONES, E.; RIDGWAY, H. J.; JASPERS, M. V. Evaluation of fungicides for the management of *Botryosphaeria* dieback diseases of grapevines. **Pest management science**, v. 68, n. 5, p. 676-683, 2012.

ANTUNES, M. D. C.; CAVACO, A. M. The use of essential oils for postharvest decay

control. A review. **Flavour and Fragrance Journal**, v.25, n.5, p. 351 – 366, 2010.

ARAÚJO, J. A. M.; COSTA, E. M. C. **Compostos derivados de nim (*Azadirachta indica* A. Juss) no controle de agentes fitopatogênicos**. In.: OLIVEIRA, V. R.; NOGUEIRA, N. W.; FREITAS, R. M. O.; COSTA, E. M.; ARAÚJO, J. A. M. (Eds.). *Nim (*Azadirachta indica* A. Juss): Aspectos gerais da propagação, cultivo e usos no controle de insetos-praga e doenças*. Offset Editora, 1. ed, p.68, 2013.

ARAÚJO, I. C. S.; FERREIRA, R. L. P. S.; MACEDO, A. T.; SANTOS, J. C.B.; SANTOS, J. A. R. Resistência cruzada entre agrotóxicos e antifúngicos de uso clínico contra *Cryptococcus neoformans*. **Revista Ceuma Perspectivas**, Ceuma, v. 30, n.1, 2017.

ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Informações comuns à espécie vegetal (droga vegetal) *Melaleuca alternifolia* e a seus derivados**. 2016. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/M47-+Melaleuca+Alternifolia.pdf/82500eae-6881-4c13-8ae8-2ab853ac3d49>. Acesso em: 11 jan. 2018.

BAIRD, R.; CARLING, D. Survival of parasitic and saprophytic fungi on intact senescent cotton roots. **Journal of Cotton Science**, Condova, v. 2, p. 27-34, 1998.

BAKKALI, F. AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oil: a review. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, n.2, p.446- 75, 2008.

BALDISSERA, M. D.; SILVA, A. S. da.; OLIVEIRA, C. B.; SANTOS, R. C.V.; VAUCHER, R. A.; RAFFIN, R. P.; GOMES, P.; DAMBROS, M. G.C.; MILETTIE, L. C.; BOLIGON, A.A.; ATHAYDE, M. L.; MONTEIRO, S. G. Trypanocidal action of tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*) against *Trypanosoma evansi* *in vitro* and *in vivo* used mice as experimental model. **Experimental Parasitology**, v. 141, p.21-27, 2014.

BARBOZA, H. S. **Efeito fungitóxico do óleo essencial de alecrim-da-chapada em *Alternaria sp.*** Mossoró, 2015.

BASTOS, C.N. Efeito do óleo de *Piper aduncum* sobre *Crinipelis perniciosae* outros fungos fitopatogênicos. **Fitopatologia Brasileira**. v.2, n.3, p.441-443, 1997.

BATISTA, V. V.; BRESSAN, D. F.; OLIGINI, K. F.; LINK, L.; FUNGHETTO, D. J.; MAZARO, S. M. Óleos essenciais no controle de *Rhizoctonia sp.* *in vitro*. In: IV CONGRESSO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DA UTFPR-DV, 2017. Dois Vizinhos. **Anais**. Dois Vizinhos: Revista da UTFPR-DV, 2017. Universidade Tecnológica Federal

do Paraná, 2017. p. 346-48.

BESTER, W.; CROUS, P.; FOURIE, P. Evaluation of fungicides as potential grapevine pruning wound protectants against *Botryosphaeria* species. **Australasian Plant Pathology**, v. 36, n. 1, p. 73-77, 2007.

BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Embrapa Meio Ambiente. Jaguariúna, SP. 2009. 334p.

BISHOP, C. D. Antiviral activity of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (Maiden & Betche) Cheel (tea tree) against tobacco mosaic virus. **Journal essential oil research**, v. 7, p. 641–644, 1995.

BRESSAN, D. F.; OLIGIN, K. F.; MAZARO, S. M.; CECHIN, F. E.; FUNGHETTO, D. J. Patologia e germinação de sementes de angico vermelho (*parapiptadenia rigida* (benth) brenan) e potencial de óleos essenciais no controle de *rhizoctonia sp.* in vitro e no tratamento de sementes, **Revista Técnico-Científica do CREA-PR**, 10. ed., p. 1 - 18, 2018.

CABOI, F.; MURGIA, S.; MONDUZZI, M.; LAZZARI, P. **Nuclear Magnetic Resonance**. Langmuir, v.18, p. 7916, 2002.

CALDEFIE-CHEZET, F.; FUSILLIER, C.; JARDE, T.; LAROYE, H.; DAMEZ, M.; VASSON, M. P.; GUILLOT, J. Potential anti- inflammatory effects of *Melaleuca alternifolia* essential oil on human peripheral blood leukocytes. **Phytother. Res.**, v. 20, p.364, 2006.

CARDOSO, J. E. E. A. **Transmissão de *Lasiodiplodia theobromae*, agente da resinose, em propágulos de cajueiro**. Embrapa Agroindústria Tropical. Fortaleza. 2009.

CARSON, C.F.; HAMMER, K.; RILEY, T.V. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil: a Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 1, p. 50–62, 2006.

CARVALHO, H.W.L. de.; LEAL, M. L.S. S.; SANTOS, M. X. dos.; CARDOSO, M. J.; MONTEIRO, J. A. A. T.; TABOSA, J. N. Adaptabilidade e estabilidade de cultivares de milho no nordeste brasileiro. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.35, n.6, p.1115-1123, 2000.

CARVALHO, H.W.L. de.; CARDOSO, M. J.; GUIMARÃES, P. E.; PACHECO, C. A. P.; LIRA, M. A. L.; TABOS, J. N.; RIBEIRO, S. S.; OLIVEIRA, V. D. de. Adaptabilidade e estabilidade de cultivares de milho no Nordeste brasileiro no ano agrícola de 2006. **Agrotópica**, v.21, n.1, p. 25-32, 2009.

CASTRO, H. G.; OLIVEIRA, L. O.; BARBOSA, L. C. A.; FERREIRA, F. A.; SILVA, D. J. H.; MOSQUIM, P. R.; NASCIMENTO, E. A. Teor e composição do óleo essencial de cinco acessos de mentrasto. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 55-57, 2004.

CASTRO, H. G.; PERINI, V. B. M.; SANTOS, G. R.; LEAL, T. C. A. B. Avaliação do teor e composição do óleo essencial de *Cymbopogon nardus* (L.) em diferentes épocas de colheita. **Revista Ciência Agronômica**, v. 41, n. 2, p. 308-314, 2010.

CILLIERS, A. A review of *Lasiodiplodia theobromae* with particular reference to its occurrence on coniferous seeds. **South African Forest Journal**, v. 166, p. 47-52, 1993.

CONAB- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos -Safra 2016/17-** Quinto Levantamento, Brasília, v.3, n.1, 2017.

CONAB- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos -Safra 2017/18 -** Nono levantamento, Brasília, v. 6, n. 9, p. 1-178, 2018.

CONCHA, J. M., MOORE, L. S., HOLLOWAY, W. J. Antifungal activity of *Melaleuca alternifolia* (Tea-tree) oil against various pathogenic organisms. **Journal. American Podiatric Medical Association**, v. 88, n. 10, p. 489-492, 1998.

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

COSTA, J.G; SANTOS, C. A.F. Cultivo da Mangueira. **Embrapa Semi-Árido**, 2ed, p. 1-111, 2004.

COTMORE, J. M. et al., Respiratory inhibition of isolated rat liver mitochondria by eugenol. **Archives of Oral Biology**, v.24, p.565-568, 1979.

COX, S.D.; MANN, C.M.; MARKHAM, J.L.; BELL, H.C.; GUSTAFSON, J.E.; WARMINGTON, J.R.; WYLLIE, S.G. The mode of antimicrobial action of the essential oil *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **Journal of Applied Microbiology**, v.88, p.170-175, 2000.

CRUZ, J.C.; FILHO, I.A.P.; DUARTE, J. O. Cultivo do milho. Embrapa Milho e Sorgo 2012. 8 ed. Disponível em: [http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoesmilho\\_8\\_ed/cultivares.htm](http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoesmilho_8_ed/cultivares.htm). Acesso em: 16 fev. 2018.

D'AURIA, F.D, LAINO, L.; STRIPPOLI, V.; TECCA, M.; SALVATORE, G.; BATTINELLI, L.; MAZZANTI, G. In vitro activity of tea tree oil against *Candida albicans* mycelial conversion and other pathogenic fungi. **Journal of Chemotherapy**, v.13, p.377–383, 2001.

DAFERERA, D.J.; ZIOGASB, B.N.; POLISSIOU, M.G. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium sp.* and *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis*. **Crop Protection**, v.22, n.1, p.39-44, 2003.

EMBRAPA. **Doenças do milho**. Brasília, DF: Embrapa Informação Agropecuária, v.6, n.72, p. 50-53, 1980.

EMBRAPA. **Patologia pós-colheita: frutas, olerícolas e ornamentais tropicais**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, v.1, n.1, p.855, 2006.

ENCINAS, O. **Development and Significance of Attack by *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griff.& Maubl. In Caribbean Pine Wood and Some Other Wood Species**. Tese de Doutorado, Swedish University of Agricultural Sciences, 1996.

FANCELLI, A. L.; DOURADO NETO, D. **Produção de milho**. Guaíba: Agropecuária. v.2, p.1-360, 2008.

FENG, W.; ZHENG, X. Essential oils to control *Alternaria alternata* *in vitro* and *in vivo*. **Food Control**, v.18, p.1126-1130, 2007.

FIALHO, R. O.; PAPA, M.F. S.; PEREIRA, D. A. S. Efeito fungitóxico de óleos essenciais sobre *Phakopsora euvitis*, agente causal da ferrugem da videira. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.82, p. 1-7, 2015.

FREIRE, F. C. O.; VIANA, F. M. P.; CARDOSO, J. E.; SANTOS, A. A. **Novos hospedeiros do fungo *Lasiodiplodia theobromae* no Estado do Ceará.** Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, p. 6, 2004.

GALET, P. Les maladies et les parasites de la vigne. Mont - Pellier, **Payson du Midi**, v. 1, 1977.

GOBATTO, D. MARRAFON, B. D.; SOUZA, A. D. CAMILO S. B. Efeito de dois óleos de melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) sobre o crescimento micelial de *Fusarium moniliforme* e *Fusarium subglutinans*. In: 3º CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS, BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS, 72., 2005, São Paulo. **Anais...**São Paulo: Arquivos do Instituto Biológico, 2005.

GONÇALVES, G.G., MATTOS, L.P.V., MORAIS, LA.S. Óleos essenciais e extratos vegetais no controle de fitopatógenos de grãos de Óleos essenciais e extratos vegetais no controle de fitopatógenos de grãos de soja. **Horticultura Brasileira**, v. 27, p. S102-S107, 2009.

HAMMER, K.A.; CARSON, C.F.; RILEY, T.V. Antifungal effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and its components on *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.53, p.1081-1085, 2004.

HAMMER, O.; HARPER, D. A. T. & RIAN, P. D. 2001. Past: Palaeontological statistics software package for education and data analysis. Version. 1.37. Disponível em: [http://palaeo-electronica.org/2001\\_1/past/issue1\\_01.htm](http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm). Acesso em: 12. nov.2005.

HAMMER, O.; HARPER, D.A.T.; RYAN, P. D. Past: paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4, issue 1, art. 4: 9pp., 178kb, 2003.

HILLEN, T.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; MESQUINI, R.M.; CRUZ, M.E.S.; STANGARLIN, J.R.; NOZAKI, M. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais no controle de alguns fitopatógenos fúngicos in vitro e no tratamento de sementes. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.14, n.3, p.439-445, 2012.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Perdas de grãos, no Brasil, chegam a cerca de 10% da colheita**, 2005. Disponível em: <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-de-noticias/releases/12911-asi-perdas-de-graos-no-brasil-chegam-a-cerca-de-10-da-colheita>. Acesso em: 25 set. 2018.

INÁCIO, M. M. et al. Diagnóstico de óleos essenciais, sobre o desenvolvimento de *Phomopsis phaseoli* var. *sojae*, *Fusarium* sp. e *Macrophomina phaseolina*. In: **2ª Jornada Científica da Unemat**, Barra do Burguês – MT, 2009.

INTERNATIONAL STANDARDS ORGANISATION 1996 – **Oil of Melaleuca, terpinen-4-ol type (Tea Tree Oil)**. International Standard ISO 4730:1996(E). Geneva. p.8, 1996.

ISMAN, M.B. Plant essential oils for pest and disease management. **Crop Protection**. v.19, p.603-608, 2000.

JARDINETTI, V. A.; CRUZ, M.E. DA SILVA.; MAIA, A, J.; OLIVEIRA, S.B.; SANTOS, E.M. Efeito de óleos essenciais no controle de patógenos na germinação de sementes de milho (*Zea mays*). In: **VII Encontro Internacional de Produção Científica**, Maringá – PR, p.25-28, 2011.

KALAGATUR, N.K., et al. Antifungal activity of chitosan nanoparticles encapsulated with *Cymbopogon martinii* essential oil on plant pathogenic fungi *Fusarium graminearum*. **Frontiers in Pharmacology**. v.9, p. 1-13, 2018.

KREUGER, M. R. O.; TERNES, C. E.; MELLO, L. L. CRUZ, A. B.; LEITE, S. N.; TAMES, D.R. The influence of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* on the healing of infected dental alveoli: A histological study in rats. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 3, p. 349-355, 2007.

KVITSCHAL, M. V.; MANTINE, E.; FILHO, M. C. G. V.; SCAPIM, C. A. Arranjo de plantas e produção de dois híbridos simples de milho. **Revista Ciência Agrônômica**. v. 41, n. 01, p. 122-131, 2010.

LEE, Y. S.; KIM, J.; SHIN, S.C.; LEE, S.G.; PARK, I.K. Antifungal activity of Myrtaceae essential oils and their components against three phytopathogenic fungi. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 23, p. 23-28, 2008.

LIMA, J. S.; CARDOSO, J. E.; MOREIRA, R. C.; ALVES, E. S.; MELO, J. G. M. Caracterização cultural de isolados de *Lasiodiplodia theobromae* e patogenicidade em plantas de aceroleira. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**. v. 6, n. 1, p. 9-16, 2012.

LIMA, J. S.; MOREIRA, R. C.; CARDOSO, J. E.; MARTINS, M. V. V.; VIANA, F. M. P. Caracterização cultural, morfológica e patogênica de *Lasiodiplodia theobromae*

associado a frutíferas tropicais. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 39, n. 2, p. 81-88, 2013.

LIMONARD, T. A modified blotter test for seed health. **Netherland Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v. 72, n. 2, p. 319-321, 1966.

LIS-BALCHIN, M.; HART, S.; DEANS, S. G. Pharmacological and Antimicrobial Studies on Different Tea Tree Oils (*M.alternifolia*, *L.scoparium* or *Manuka* and *K.ericoides* or *Kanuka* ), Originating in Australia and New Zealand. **Phytotherapy Research**, v.14, p.623-629, 2000.

LUCAS, G. C.; ALVES, E.; PEREIRA, R. B.; PERINA, F. J.; SOUZA, R. M. Antibacterial activity of essential oils on *Xanthomonas vesicatoria* and control of bacterial spot in tomato. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n. 3, p. 351–359, 2012.

LUIZ, C.; ROCHA NETO, A.C.; FRANCO, P. O.; DI PIERO, R.M. Nanoemulsions of essential oils and aloe polysaccharides: Antimicrobial activity and resistance inducer potential against *Xanthomonas fragariae*. **Tropical Plant Pathology**, v. 42, n. 5, p.370-381, 2017.

MA, H. X.; ZHANG, H. J.; SHI, J.; DANG, J.J.; CHANG, Y.; CHEN, D.; HU, Q. Y.; GUO, N.; HAN, H. L. First Report of *Lasiodiplodia theobromae* Causing Maize Ear Rot in Hainan Province in Southern China, **Plant Disease** v.100, n.10, p. 2160, 2016.

MAGALHÃES, P. C.; SOUZA, T.C. **Cultivo de Milho: Ecofisiologia**, 2013.  
Disponível em:  
[http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho\\_8\\_ed/ecofisiologia.html](http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho_8_ed/ecofisiologia.html). Acesso em: 22 jan. 2018.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – Registro sob o nº 001193, 2009. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 13 nov.2018.

MARCONDES, M. M. **Incidência de podridão de colmo e grãos ardidos em híbridos de milho sob diferentes densidades de plantas e épocas de colheitas / Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual do Centro-Oeste - UNICENTRO, Guarapuava, 2013.**

MARINELLI, E et al. Activity of Some Essential Oils against Pathogenic Seed Borne Fungi on Legumes. **Asian Journal of Plant Pathology**, v. 6, p. 66-74, 2012.

MARTINS, J. A. S.; SAGATA, E.; SANTOS, V. A.; JULIATTI, F. C. Avaliação do efeito do óleo de *Melaleuca alternifolia* sobre o crescimento micelial in vitro de fungos fitopatogênicos. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 27, n. 1, p. 49-51, 2010.

MATOS, D. L.; MARTES, I. N.; SILVA, A. P.R.; ALVES, C. F.; DAVID, G. Q.; PERES, W. M. Controle alternativo de *Lasiodiplodia theobromae* com óleos vegetais. **Cadernos de Agroecologia**. Anais do VI CLAA, X CBA e V SEMDF, v.13, n. 1, p. 1-7, 2018.

MCKEVITH, B. Nutritional aspects of cereals. **Nutrition Bulletin**, v. 29, p. 111-142, 2004.

MÉDICE, R., ALVES, E.; ASSIS, R. T.; JÚNIOR, R. G. M; LOPES, E. A. G. L. Óleos essenciais no controle da Ferrugem Asiática da soja *Phakopsora pachyrhizi* Syd, & P. Syd. **Ciência agrotecnológica**, v.31, n.1, p.83-90, 2007.

MIKUS, J.; HARKENTHAL, M.; STEVERDING, D.; REICHLING, J. In vitro Effect of Essential Oils and Isolated Mono and Sesquiterpenes on *Leishmania major* and *Trypanosoma brucei*. **Planta Medica**, v. 66, p. 366-368, 2000.

MIRANDA, A. A. C. de; MELO, L. F.; ARAÚJO, A. E. de. **Impactos dos agrotóxicos na saúde do solo e humana: uma revisão**. In: II Congresso Internacional das Ciências Agrárias- COINTER, PDVAgro, 2017.

MOHALI, S.; BURGESS, T. I.; WINGFIELD, M. J. Diversity and host association of the tropical tree endophyte *Lasiodiplodia theobromae* revealed using simple sequence repeat markers. **Florest Pathology**, v. 35, p. 385-396, 2005.

MONDEGO, J.M. et al. Controle alternativo da microflora de sementes de *Pseudobombax marginatum* com óleo essencial de copaíba (*Copaifera sp.*). **Bioscience Journal**, v.30, n.2, p.349-355, 2014.

MORAIS L.A.S; RAMOS, N. P.; BETTIOL, W; CHAVES, F.C.M. **Efeito de óleos essenciais na germinação e sanidade de sementes de soja**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 48. Horticultura Brasileira 26, 2008.

MORAIS, L.A.S.; RAMOS, N.P.; GONÇALVES, G.G.; BETTIOL, W.; CHAVES, F.C.M. Atividade antifúngica de óleos essenciais em sementes de feijão cv.carioquinha. **Horticultura Brasileira**, v.26, n.2, p.S6261-S6266, 2008.

MULLEN, J. M.; AL, E. Canker of dogwood caused by *Lasiodiplodia theobromae*, a disease influenced stress or cultivar selection. **Plant Disease**, v. 75, p. 886-889, 1991.

NAKATSU, T.; LUPO, A.T.; CHINN, J.W.; KANG, R.K.L. Biological activity of essential oils and their constituents. **Stud. Nat. Prod. Chem.**, v. 21, p.571–631, 2000.

NARDELLI, A.; D'HOOGIE, A.; DRIEGHE, J.; et al. Allergic contact dermatitis from fragrance components in specific topical pharmaceutical products in Belgium. **Contact Dermatitis**; v.60, p. 303-313, 2009.

NASCIMENTO, D. M.; VIEIRA, F.E. C.; BATISTA, T. B.; KOYANAGUI, M.; BARDIVIESSO, E. M.; VIEIRA, G. H. C. Controle *in vitro* do *Fusarium sp.* Causador da Fusariose na Soja. **Cadernos de Agroecologia**, v. 9, n. 4, 2014.

NASCIMENTO, D. M. **Efeito do tratamento de sementes de pimentão com óleos essenciais sobre o controle de *Colletotrichum gloeosporioides* e o potencial fisiológico das sementes**. Dissertação (Mestrado em Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista- UNESP. Botucatu, 2017.

NUNES, F.M.; OLIVEIRA, M.C.F.; ARRIAGA, A. M.C.; LEMOS, T.L.G.; ANDRADE-NETO, M.; MATTOS, M. C.; MAFEZOLI, J.; VIANA, F.M.P.; FERREIRA, V. M.; RODRIGUES-FILHO, E.; FERREIRA, A. G. A New Eremophilane-type Sesuiterpene from the Phytopatogen Fungus *Lasiodiplodia theobromae*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, n.3, p. 478-482, 2008.

OLIVEIRA, J.A. **Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativas* L.) e pimentão (*Capsicumannum* L.)**. 1991. 111 f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, 1991.

OLIVEIRA, M. Z.; PRATES JÚNIOR, P.; ASSMAR, C. C.; BARBOSA, C. J. Ocorrência e sintomas de *Lasiodiplodia theobromae* na Bahia. **Tropical Plant Pathology**, v.37, n 1, 2012.

OLIVEIRA, M. Z. A.; PRATES JÚNIOR, P.; BARBOSA, C. DE J.; ASSMAR, C. C. **Fungo *Lasiodiplodia theobromae*: um problema para agricultura baiana**. Embrapa Mandioca e Fruticultura-Artigo em periódico indexado (ALICE), 2013. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/962191/1/FungoLasiodiplodiatheobromae.pdf>. Acesso em: 08 jun.2018.

ORLANDELLI, R. C.; ALBERTO, R.N.; ALMEIDA, T.T.; AZEVEDO, J.L.; PAMPHILE, J.A. In vitro antibacterial activity of crude extracts produced by endophytic fungi isolated from *Piper hispidum* Sw. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 2, p. 137-141, 2012.

PEIXINHO, G.S.; RIBEIRO, V.G.; AMORIM, E.P.R. Ação do óleo essencial de menta (*Mentha arvensis*) sobre o patógeno *Lasiodiplodia theobromae* em cachos de videira cv. Itália. **Summa Phytopathologica**, v.43, n.1, p.32-35, 2017a.

PEIXINHO, G.S.; RIBEIRO, V.G.; AMORIM, E.P.R. Controle da Podridão seca (*Lasiodiplodia theobromae*) em cachos de videira cv. Itália por óleos essenciais e quitosana. **Summa Phytopathologica**, v.43, n.1, p.26-31, 2017b.

PEREIRA, R.B.; ALVES, E.; RIBEIRO JÚNIOR, P.M.; RESENDE, M.L.V de; LUCAS, G.C.; FERREIRA, J.B. Extrato de casca de café, óleo essencial de tomilho e acibenzolar-S-metil no manejo da cercosporiose-do-cafeeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, p.1287-1296, 2008.

PEREIRA, R.B.; RESENDE, M.L.V. de; RIBEIRO JÚNIOR, P.M.; AMARAL, D.R.; LUCAS, G.C.; CAVALCANTI, F.R. Ativação de defesa em cacaueteiro contra a murcha-de-verticílio por extratos naturais e acibenzolar-S-metil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, p.171-178, 2008.

PEREIRA, A.L.; SILVA, G.S.; RIBEIRO, V.Q. Caracterização fisiológica, cultural e patogênica de diferentes isolados de *Lasiodiplodia theobromae*. **Fitopatologia Brasileira**, v.31, p.572-578, 2006.

PEREIRA, R.B.; LUCAS, G. C.; PERINA, F. J.; RESENDE, M. L. V. de; ALVES, E. Potential of essential oils for the control of Brown eye spot in coffee plants. **Ciência e Agrotecnologia**, v.35, n.1, p.115-23, 2011.

PINTO, N.F.J. de A. Patologia de sementes de milho. **Circular Técnica 29**, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Sete Lagoas –MG, p. 44, 1998.

POLETTO, T. MACIEL, C. G.; MUNIZ, M. F. B.; BRIOSO, P. S. T. First report of stem canker caused by *Lasiodiplodia subglobosa* on *Carya illinoensis* in Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, 2016.

PUNITHALINGAM, E. *Botryodiplodia theobromae*. **C.M.I.** - Descriptions of

pathogenic fungi and bactéria. n. 519, 1976.

RAMOS, D. P.; BARBOSA, R. M.; VIEIRA, B. G. T. L.; PANIZZI, R.C., VIEIRA, R. D. Infecção por *Fusarium graminearum* e *Fusarium verticillioides* em sementes de milho. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.44, n.1, p.24-31, 2014.

RAMOS, K.; ANDREANI JUNIOR, R.; KOZUSNY- ANDREANI, D.I. Óleos essenciais e vegetais no controle *in vitro* *Colletotrichum gloeosporioides*, **Rev. Bras. Pl. Med.**, v.18, n.2, supl. I, p.605-612, 2016.

RASOOLI, I.; REZAEI, M.B.; ALLAMEH, A. Inibição do crescimento e alterações morfológicas de *Aspergillus niger* por óleos essenciais de *Thymus eriocalyx* e *Thymus x-porlock*. **Controle de Alimentos**, Guildford, v.17, p.359-364, 2006.

RODRIGUES, E. A. SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J.; SCAPIM, C. A.; FIORI-TUTIDA, A. C. G. Potencial da planta medicinal *Ocimum gratissimum* no controle de *Bipolaris sorokiniana* em sementes de trigo. **Acta Scientiarum Agronomy**, v.28, p. 213-220, 2006.

ROLSHAUSEN, P. E.; ÚRBEZ-TORRES, J. R.; ROONEY-LATHAM, S.; ESKALEN, A.; SMITH, R. J.; GUBLER, W. D. Evaluation of pruning wound susceptibility and protection against fungi associated with grapevine trunk diseases. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 61, n. 1, p. 113-119, 2010.

ROSSI, E.; COSIMI, S.; LONI, A. Bioactivity of essential oils from Mediterranean plants: Insecticidal properties on *Sitophilus zeamais* and effects on seed germination. **Journal of Entomology**, v.9, n.6, p.403-412, 2012.

ROZWALKA, L. C.; DA COSTA, M. L. R. Z.; DE MIO, L. L. M.; NAKASHIMA, T. Extratos, decoctos e óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas na inibição de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides* de frutos de goiaba. **Ciência Rural**, v. 38, n. 2, p.301-307, 2008.

RUBINI, M. R.; AL, E. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicios*, causal agent of witches broom disease. **International Journal of Biological Sciences**, v. 1, p. 24-33, 2005.

RUSSEL, M.; SOUTHWELL, I. Monoterpenoid accumulation in *Melaleuca alternifolia* seedlings. **Phytochemistry**, v.59, p.709-716, 2002.

SACHS, C.; CASA, R. T.; PILETTI, G. J.; NETTO, L. A.; FINGSTAG, M.; NERBA, F.; STOLTZ, J. C.; ZANCAN, R.; BAMPI, D.; AGOSTINETTO, L. Incidência de *Fusarium verticillioides* em sementes de milho e transmissão para o sistema radicular e parte aérea da planta. In: Congresso Nacional de Milho e Sorgo, 29, 2012, Águas de Lindóia. **Anais...** Águas de Lindóia: Embrapa, 2012, p.614-620.

SALUSTIANO, M.E. FERRAZ FILHO, A. C.; AMPÉLIO POZZA, E.; CASTRO, H. A. Extratos de candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish) na inibição in vitro de *Cylindrocladium scoparium* e de quatro espécies de ferrugens. **CERNE**, v.12, p.189-93, 2006.

SANTOS, A.A.; CARDOSO, J.E.; FREIRE, F.C.O. **Fungos associados a sementes de gravioleira e de ateira no Estado do Ceará.** Fortaleza: Embrapa-CNPAT, 2000.11p.

SANTOS, J. F.; GRANGEIRO, J. I. T.; BRITO, L. M. P. Variedades e híbridos de milho para a mesorregião do Agreste Paraibano, **Tecnol. & Ciên. Agropec.**, João Pessoa, v.3, n.3, p.13-17, 2009.

SHAHBAZ, M. Z.; IQBAL, A.; SALLEM, M. A. Association of *Lasiodiplodia theobromae* with different decline disorders in mango (*Mangifera indica* L.). **Pakistan Journal Botany**, Karachi, v. 41, n. 1, p. 359- 368, 2009.

SHAO, X.; WANG, H.; XU, F.; CHENG, S. Effects and possible mechanisms of tea tree oil vapor treatment on the main disease in postharvest strawberry fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 77, p. 94–101, 2013.

SINHA, S.; JOTHIRAMAJAYAM, M.; GHOSH, M.; MUKHERJEE, A. Evaluation of toxicity of essential oils palmarosa, citronella, lemongrass and vetiver in human lymphocytes. *Food Chem. Toxicol.* v.68, p.71–77, 2014.

SILVA, D. M. M. H.; BASTOS, C. N. Atividade Antifúngica de Óleos Essenciais de Espécies de *Piper* Sobre *Crinipellis pernicioso*, *Phytophthora palmivora* e *Phytophthora capsici*. **Fitopatologia Brasileira**, v.32, p.143-145, 2007.

SILVA, J. C.; SILVA, A. A.S.; ASSIS, R. T. **Sustentabilidade produtiva e inovação no campo** Uberlândia: Composer, v.1, p. 1-234, 2013.

SIMÕES, R. P. Efeito do óleo de *Melaleuca alternifolia* sobre a infecção estafilocócica. **Revista Lecta**. Bragança Paulista, n. 2, v. 20, p. 143-152, 2002.

SOUZA, C. N.; FERNANDES, P. R. **Avaliação do poder antimicrobiano do óleo de melaleuca e da planta *Vernonia scorpioides* em alveolite induzida em ratos.** Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade do Vale do Itajaí. Itajaí, 2006.

SOUZA, A.D.; ROGGERIO, T.U; FURLAN, M.R.; AOYAMA, E.M. Óleo de melaleuca (*Melaleuca alternifolia* Maiden & Betche, Cheel) no controle de cercosporiose em beterraba. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.17, n.4, supl. III, p.1078-1082, 2015.

SOYLU, E. M.; KURT, S.; SOYLU, S. In vitro and in vivo antifungal activities of the essential oils of various plants against tomato grey mould disease agent *Botrytis cinerea*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 143, n. 3, p. 183-189, 2010.

STANGARLIN, J.R.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; CRUZ, M.E.S.; NOZAKI, M.H. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, Brasília, v.2, n.11, p.16-21, 2003.

TAKAHASHI, J. P.; MELHEM, M. S.C. Uso de fungicidas na agricultura e resistência a antifúngicos na clínica médica. **Bol Inst Adolfo Lutz.**, p.24, v.1, p40-41, 2014.

TRINDADE, C.C. **Sementes crioulas e transgênicas, uma reflexão sobre sua relação com as comunidades tradicionais.** Trabalho apresentado no XV Congresso Nacional do Compedi, 15-18 novembro, Manaus, Amazonas, 2006.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE - USDA. Production, Supply and Distribution (PSD) on line. Disponível em: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/app/index.html#/app/advQuery>. Acesso em: 28 nov. 2017.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE - USDA. Grain: World Markets and Trade. Novembro, 2017. Disponível em: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/grain.pdf>. Acesso em: 30 nov. 2017b.

VENTUROSOS, L.R.; BACCHI, L. M. A.; GAVASSONI, W. L.; CONUS, L.A.; PONTIM, B. C. A.; BERGAMIN, A. C. Atividade antifúngica de extratos vegetais sobre o desenvolvimento de fitopatógenos. **Summa Phytopatologica**, Jaguariuna, v.37, n.1, p.18-23, 2011a.

VENTUROSOS, L. R. BACCHI, L.M.A.; GAVASSONI, W.L.; CONUS, L.A.;

PONTIM, B.C.A.; SOUZA, F.R. Inibição do crescimento in vitro de fitopatógenos sob diferentes concentrações de extratos de plantas medicinais. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 78, n.1, p.89-95, 2011b.

VIEIRA, T. R.; BARBOSA, L. C. A.; MALTHA, C. R. A.; PAULA, V. F.; NASCIMENTO, E. A. Chemical constituents from *Melaleuca alternifolia* (Myrtaceae). **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 4, 2004.

VIEGAS, E.C; SOARES, A; CARMO, M.G. F; ROSSETTO C.A.V.Toxicidade de óleos essenciais de alho e casca de canela contra fungos do grupo *Aspergillus flavus*. **Horticultura Brasileira**, v. 23, p. 915-918, 2005.

VIGAN, M. Essential oils: renewal of interest and toxicity, **Eur J Dermatol**, v.20, n. 6, p. 685-692, 2010.

VILLAR, D.; KNIGHT, M.J.; HANSEN, S.R; BUCK, W.B. Toxicity of melaleuca oil and related essential oils applied topically on dogs and cats. **Vet. Hum. Toxicol.**, v.36, p.139-42, 1994.

VITTI, A. M. S.; BRITO, J. O. **Óleo essencial de eucalipto**. Piracicaba: ESALQ 2003 26p.

WARDLE, D.A.; PARKINSON, D. Effects of three herbicides on soil microbial biomass and activity. **Plant and Soil**. v.122, p.21-28, 1990.

WORDELL FILHO, J. A.; CASA, R. T. Doenças na cultura do milho. In. WORDELL FILHO, J. A.; ELIAS, H. T. (Org.). **A cultura do milho em Santa Catarina**. Florianópolis, SC, Epagri, p. 207-273. 2010.

YU, D.; WANG, J.; SHAO, X.; XU, F.; WANG, H. Antifungal modes of action of tea tree oil and its two characteristic components against *Botrytis cinérea*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 119, p. 1253-1262, 2015.

ZACARONI, L.M.; CARDOSO, M.G.; SOUZA, P.E.; PIMENTEL, F.A.; GUIMARÃES, L; SALGADO, A.P; Potencial fungitóxico do óleo essencial de *Piper hispidinervum* sobre os fungos fitopatogênicos *Bipolaris sorokiniana*, *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum gloeosporioides*. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 39, n. 1, p. 193-198, 2009.

ZANANDREA, L.; JULIANO D. S.; ANDRÉA, B. M.; JULIANE, L.; VERIDIANA K.

B. Atividade do óleo essencial de orégano contra fungos patogênicos do arroz: crescimento micelial de fungos em placas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.14, supl.1, p.14-6, 2004.