



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AGROALIMENTAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SISTEMAS AGROINDUSTRIAIS**

FLÁVIA MOTA DE FIGUEREDO ALVES

**POTENCIAL FUNGITÓXICO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Melaleuca alternifolia* NO
CONTROLE DE ALTERNARIOSE EM SEMENTES DE FEIJÃO-CAUPI**

POMBAL – PB

2019

FLÁVIA MOTA DE FIGUEREDO ALVES

**POTENCIAL FUNGITÓXICO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Melaleuca alternifolia* NO
CONTROLE DE ALTERNARIOSE EM SEMENTES DE FEIJÃO-CAUPI**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sistemas Agroindustriais PPGSA, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre pela Universidade Federal de Campina Grande - UFCG/CCTA

Orientador: Prof. D.Sc. Tiago Augusto Lima Cardoso

POMBAL – PB

2019

A474p

Alves, Flávia Mota de Figueredo.

Potencial fungitóxico do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* no controle de alternariose em sementes de feijão-caupi / Flávia Mota de Figueredo Alves. – Pombal, 2019.

38 f. : il. color.

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. *Alternaria alternata*. 3. Fungos fitopatogênicos - Controle alternativo. 4. Patologia de sementes. I. Cardoso, Tiago Augusto Lima. II. Título.

CDU 632.952(043)



Centro de Ciências e Tecnologia Agroalimentar



CAMPUS DE POMBAL

“POTENCIAL FUNGITÓRIO DO ÓLEO ESSENCIAL DE MELALEUCA ALTERNIFOLIA NO CONTROLE DE ALTERNARIOSE EM SEMENTES DE FEIJÃO-CAUPI”

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Sistemas Agroindustriais do Centro de Ciências e Tecnologia Agroalimentar da Universidade Federal de Campina Grande, Campus Pombal-PB, em cumprimento às exigências para obtenção do Título de Mestre (M. Sc.) em Sistemas Agroindustriais.

Aprovada em 34 / 06 / 2019

COMISSÃO EXAMINADORA


Tiago Augusto Lima Cardoso
Orientador


Everton Vieira da Silva
Examinador Interno


Heber Rangel Formiga Leite de Almeida
Examinador Externo

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 PPCSA: 3431-4016 COORDENAÇÃO DO PPCSA: 3431-4069



Scanned with
CamScanner

DEDICATÓRIA

A Deus, meu senhor e salvador, a ele toda honra e toda glória! Por sua fidelidade, seu amor e sua providência.

Ao meu esposo Alexandre Machado Alves Costa e meu filho Guilherme Mota Machado Alves, por todo amor e compreensão durante esse período e por ser tão presente, me ajudando sempre, seja em qual for à ocasião.

Aos meus pais Francisco Gomes de Figueredo e Maria Regina Mota Gomes, pela incansável busca em me fazer uma pessoa melhor, por me incentivarem a buscar cada dia crescer através do conhecimento proporcionando-me estímulo necessário para vencer sempre, ao meu irmão Fábio Mota de Figueredo pelo carinho e perseverança de sempre.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me abençoar sempre e estar presente em todos os momentos de minha vida, dando-me forças para resistir os obstáculos e me concedendo a graça de estar alcançando mais um sonho realizado.

Ao meu orientador e técnico do laboratório de Fitopatologia Tiago Augusto Lima Cardoso, por cumprir com excelência o papel de orientador e amigo, pela paciência, dedicação, por sempre acreditar em mim, pela confiança, pela presença constante em todos os momentos que precisei, por não medir esforços para que eu chegasse até aqui.

Ao meu coorientador, o professor Antônio Francisco de Mendonça Junior, meu mentor, e amigo. Pelas palavras de apoio sempre prontas, por ser o ombro amigo que tantas vezes precisei, por acreditar em mim, a ele a minha eterna gratidão.

À professora Ana Paula Medeiros dos Santos Rodrigues, pela sua importante contribuição, compreensão e ensinamentos a mim prestados no início onde tudo começou.

Aos professores Everton Vieira da Silva e Helber Rangel Formiga Leite de Almeida pela contribuição junto ao meu trabalho.

Aos colegas e amigos do grupo de pesquisa “Proteção de plantas na Agricultura Sustentável”, em especial ao meu amigo Kevison Romulo da Silva França, pela importante contribuição desde o início, e pela amizade construída.

À UFCG Campus Pombal-PB, por toda oportunidade concedida de ampliação de conhecimentos, pela dedicação dos professores e funcionários e por formarmos um vínculo de amizade ao longo desse período, amizade esta que levarei durante toda minha vida.

Enfim, a todos que de uma maneira direta ou indireta contribuíram para realização deste sonho. Muito obrigada!

RESUMO

Apesar da espécie (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) constituir uma das principais ocorrências fitopatológicas nos campos cultivados. Diversas causas têm sido levantadas para explicar esse comportamento, entre elas destacam-se as doenças fúngicas, sobretudo aquelas cujos patógenos são transmitidos por sementes. Visando fornecer um produto ambientalmente seguro para o controle dessas doenças, objetivou-se com este trabalho avaliar potencial fungitóxico do óleo essencial de melaleuca sobre o crescimento micelial de *Alternaria alternata* *in vitro* e no tratamento de sementes de feijão 'Caupi'. No experimento *in vitro* o óleo essencial foi incorporado ao meio de cultura e vertido em placas de Petri. Os tratamentos consistiram em diferentes concentrações do óleo (0,0125; 0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,25; 0,50; 0,75 e 1,0%), a testemunha negativa (0,0%) e a testemunha positiva suplementado com fungicida comercial (Tiram). Discos de meio de cultura com micélios do fungo foram inoculados no centro das placas que foram incubadas por 7 dias a 27 ± 2 °C. O crescimento foi mensurado e calculados a porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) e o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM). No experimento *in vivo*, as sementes foram tratadas com diferentes concentrações do óleo (0; 0,2; 0,5; 1 e 5%), uma testemunha negativa (0,0%) e uma testemunha positiva (Tiram 1 ml). Após os tratamentos, foi realizada a inoculação artificial em colônias do fungo, e posteriormente a isso foi realizado o teste de sanidade nas sementes. Foi avaliada a porcentagem de sementes infectadas pelo fungo 7 dias após os tratamentos. Em condições *in vitro*, o óleo essencial de melaleuca reduziu o crescimento micelial de *A. alternata* em todas as concentrações testadas. A partir da concentração de 0,2% houve inibição total do crescimento fúngico. No tratamento das sementes, o óleo essencial não exerceu controle significativo na porcentagem de sementes infectadas.

Palavras-chave: *Alternaria alternata*, Controle alternativo, Fungos fitopatogênicos, Patologia de sementes.

ABSTRACT

The cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) has great importance for agriculture in northern and northeastern regions of Brazil. The physiological quality of seeds plays an essential role in crop yield, decreasing the occurrence of diseases in the field. This study aimed to evaluate the fungitoxic potential of Melaleuca essential oil on the mycelial growth of *Alternaria alternata* under *in vitro* condition and the treatment of cowpea beans. In the *in vitro* experiment, the essential oil was incorporated into the culture medium and poured into Petri dishes. The treatments consisted of different concentrations of the oil (0.0125, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.25, 0.50, 0.75, and 1.0%), a negative control (0%), and a positive control (Tiram). Discs of culture medium with fungal mycelia were inoculated in the center of the plates and incubated for seven days at $27 \pm 2^\circ\text{C}$. Growth was measured to calculate the percentage of inhibition of mycelial growth (PIC) and mycelial growth rate index (IVCM). In the *in vivo* experiment, seeds were immersed in solutions with different concentrations of oil (0.0, 0.2, 0.5, 1.0, and 5.0%), a negative control (0.0%), and a positive control (Tiram). After the treatments, seeds were artificially inoculated with colonies of the fungus, and after that, we performed the seed sanity test. The percentage of seeds infected by the fungus was assessed seven days after the treatments. Under *in vitro* conditions, all concentrations of melaleuca essential oil reduced the mycelial growth of *A. alternata*. The oil reached complete inhibition of fungal growth from 0.2% concentration and above. In the cowpea treatment, the essential oil had no significant control over the percentage of infected seeds.

Keywords: *Alternaria alternata*, Alternative control, Mycelial growth, Phytopathogenic fungi.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Procedimentos de incorporação dos tratamentos ao meio de cultura e inoculação de <i>Alternaria alternata</i>	20
Figura 2	Efeito das concentrações do óleo essencial de melaleuca (<i>Melaleuca alternifolia</i>) sobre o crescimento micelial de <i>Alternaria alternata</i>	23
Figura 3	Porcentagem de inibição de crescimento de <i>Alternaria alternata</i> em diferentes concentrações do óleo essencial de melaleuca (<i>Melaleuca alternifolia</i>) e nos tratamentos testemunha.....	25
Figura 4	Efeito das concentrações do óleo essencial de melaleuca (<i>Melaleuca alternifolia</i>) sobre a incidência de sementes de feijão-caupi infectadas por <i>Alternaria alternata</i>	26
Figura 5	Porcentagem de sementes de feijão-caupi infectadas por <i>Alternaria alternata</i> após o tratamento com diferentes concentrações do óleo essencial de melaleuca (<i>Melaleuca alternifolia</i>) e nos tratamentos testemunha.....	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Principais componentes do óleo essencial de melaleuca (<i>Melaleuca alternifolia</i>).....	19
----------	--	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1	Cultura do feijão-caupi (<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp)	12
2.2	Qualidade fisiológica de sementes	13
2.3	Doenças em sementes de feijão	13
2.4	Gênero <i>Alternaria</i>	14
2.4.1	<i>Alternaria alternata</i>	15
2.5	Óleos essenciais	15
2.5.1	Óleo de <i>Melaleuca alternifolia</i>	16
3	MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1	Local dos experimentos e obtenção dos materiais	19
3.2	Efeito do óleo essencial de melaleuca sobre <i>Alternaria alternata</i>	19
3.3	Efeito do óleo essencial de melaleuca sobre <i>Alternaria alternata</i> em sementes de feijão-caupi	21
3.4	Análise estatística	21
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
4.1	Efeito do óleo essencial de melaleuca sobre <i>Alternaria alternata</i>	23
4.2	Efeito do óleo essencial de melaleuca sobre <i>Alternaria alternata</i> em sementes de feijão-caupi	25
5	CONCLUSÕES	28
	REFERÊNCIAS	29

1 INTRODUÇÃO

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp), popularmente conhecido como feijão-de-corda ou feijão-macassar, constitui-se em fonte de proteínas e alimento básico para grande parte da população das regiões Norte e Nordeste do Brasil, sendo assim uma das culturas mais importantes do país (NEVES *et al.*, 2011). Conforme a CONAB (2019), o Brasil ocupa a terceira posição na produção mundial de feijão, com uma área de cultivo de aproximadamente um milhão de hectares, sendo as regiões Norte e Nordeste as responsáveis por cerca de 90% da área cultivada (SANTOS *et al.*, 2017).

O cultivo do feijão-caupi apresenta custo de produção bastante competitivo, fator que tem feito aumentar o interesse dos produtores pela cultura. Além disso, a produção brasileira é de alta qualidade, possibilitando que o produto tenha boa aceitação em todos os integrantes de sua cadeia produtiva (FREIRE FILHO *et al.*, 2011).

No entanto, as doenças representam um fator limitante à expansão dos rendimentos. Os fungos são os principais fitopatógenos causadores de perdas econômicas na cultura do feijão. Quando presentes na semente, eles podem causar danos mais frequentes como abortos, deformações e descoloração da casca, o que sempre leva a redução do potencial germinativo e vigor das sementes, e quando alocadas no campo resultarão em estandes de plantas desuniformes com baixa ou nenhuma produção (MACHADO, 2012).

Dentre os fungos que apresentam um maior impacto econômico em sementes de feijão-caupi destacam-se: *Macrophomina phaseolina* (ATHAYDE SOBRINHO, 2005), *Fusarium* spp. (RODRIGUES; MENEZES, 2002), *Rhizoctonia solani* (NECHET; VIEIRA, 2006), *Curvularia* spp., *Trichoderma* spp. (SINHA *et al.*, 1999), *Alternaria* spp. (MARQUES *et al.*, 2006), além dos diversos fungos de armazenamento, como *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. (TORRES; BRINGEL, 2005).

Considerando as práticas de controle de patógenos que acometem o feijão, o tratamento químico tem sido uma medida convencionalmente utilizada. Porém a utilização desses insumos tem sido associada a danos significativos à saúde humana e ao meio ambiente devido à sua alta toxicidade (CANDIDO E SILVA; MELO, 2013; PERINA, 2014), além de contribuir para o surgimento de cepas resistentes destes fitopatógenos (HILLEN *et al.*, 2012).

Neste cenário, é necessário a utilização de produtos alternativos aos defensivos químicos que apresentem efeito similar, porém que não sejam nocivos à saúde humana e ao meio ambiente. Entre os produtos estudados destaca-se os óleos essenciais extraídos de plantas

aromáticas que têm apresentado propriedades fungitóxicas sobre fitopatógenos evidenciadas em diversos estudos (ABDEL-KADER; EL-MOUGY; LASHIN, *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2014; SANTOS *et al.*, 2014).

O óleo essencial de melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) tem sido estudado há alguns anos e a sua atividade antimicrobiana tem sido bem documentada. Os principais componentes do óleo essencial são: terpineol, cineol, terpeneno, cimeno, limoneno e sabineno (CARSON; HAMMER; RILEY, 2006). A maioria dos compostos possui atividade inibitória contra fungos e bactérias (SAGAVE, 2014). Dentre estes, o terpineol é o principal constituinte antifúngico (VIEIRA *et al.*, 2004). No controle de fitopatógenos o seu uso tem mostrado resultados promissores no controle fúngico do *Cercospora beticola* Sacc (SOUZA *et al.*, 2015), *A. alternata*, *A. niger*, *M. phaseolina*, *Penicillium sp.* e *S. sclerotiorum* (MARTINS *et al.*, 2010) em diferentes concentrações do óleo de melaleuca observaram que este reduziu o crescimento micelial, o que demonstra uma altíssima atividade antimicrobiana desse óleo, para os patógenos em questão.

Os óleos essenciais, quando utilizados no controle de fitopatógenos, apresentam vantagens em relação aos defensivos químicos utilizados, e o sucesso destes óleos está relacionado à sua capacidade de dissolver-se em meio lipídico, permitindo que haja uma harmonia entre o óleo e os componentes lipídicos presentes nas células dos patógenos, causando modificações na estrutura dos mesmos (BRUM, 2012). O uso de óleos essenciais vem mostrando-se como uma boa alternativa, estes, por sua vez, apresentam uma baixa toxicidade, rápida degradação pelo meio ambiente e são seguros a saúde humana (SILVA *et al.*, 2018). Desta forma, objetivou-se avaliar o potencial fungitóxico do óleo essencial de melaleuca sobre o crescimento micelial de *Alternaria alternata in vitro* e no tratamento de sementes de feijão-caupi.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Cultura do feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp)

O feijão-caupi tem origem africana e foi introduzido no Brasil por colonizadores portugueses no início de XVI, inicialmente no estado da Bahia e posteriormente em todo o país (OLIVEIRA, 2008). Este feijão constitui um dos principais ingredientes alimentares das populações rural e urbana das regiões Norte e Nordeste do Brasil, devido a sua riqueza em proteínas, aminoácidos essenciais, carboidratos, vitaminas, minerais e fibras. Sua comercialização nessas regiões ocorre na forma de grãos secos e verdes, normalmente nas cores marrom, sempre-verde e branco (BASTOS, 2017)

O feijão-caupi pertence ao gênero *Vigna*, da família Fabaceae, o qual é composto por mais de 200 espécies, das quais cerca de 20 espécies são típicas das regiões tropicais. As espécies de maior importância econômica e nutricional são *Vigna unguiculata* (L.) Walpers, *V. radiata* (L.) Wilczek e *V. mungo* (L.) Hepper. No Brasil, *V. unguiculata* é conhecida por diferentes nomes populares, tais como feijão-caupi, feijão-de-corda, feijão-fradinho, feijão-frade, feijão-miúdo ou feijão-macassar. A expansão desta cultura ocorreu, especialmente, devido à sua tolerância à seca, podendo ser cultivada em diferentes condições de clima e solo (NEVES *et al.*, 2011).

De acordo com FAO (2018), os maiores produtores mundiais de feijão são Myanmar, Índia, Brasil, Estados Unidos, México e Tanzânia, responsáveis por 15,3 milhões de toneladas anuais, o que representa 56,99% do total produzido no mundo. A produtividade média no Brasil dessa cultura é considerada ainda muito baixa. No ano de 2015, essa cultura ocupou uma área cultivada de mais de 1 milhão de hectares, com produtividade média de 419 kg ha⁻¹ (EMBRAPA, 2018). O rendimento da cultura varia muito entre as diferentes regiões do País em virtude das variações climáticas e da utilização de genótipos pouco produtivos (FREIRE FILHO, 2011). Os rendimentos também podem ser afetados pela incidência de doenças (HALL, 1994; BIANCHINI *et al.*, 2005) e ainda pelos diferentes manejos do sistema solo-água-planta, que interferem na prevalência ou não de doenças (REIS *et al.*, 2005).

Dentre os principais fatores que afetam a produção do feijão-caupi no Brasil encontram-se patógenos que interferem no rendimento de grãos e que prejudicam a qualidade e quantidade de sementes, sendo que os vírus e fungos agrupam o maior número de espécies nocivas a essa cultura (FERNANDES, 2005). Entre as principais podridões de raiz/caule observadas em

feijão-caupi, destacam-se, por serem mais severas, a podridão de *Pythium* (*Pythium* sp.), a rizoctoniose (*Rhizoctonia solani* Kuhn), que causa a morte de plantas adultas em reboleira, a podridão cinzenta do caule [*Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid], a murcha de esclerócio (*Sclerotium rolfsii* Sacc.) e a podridão-fusariana (*Fusarium* spp.) (ATHAYDE SOBRINHO *et al.*, 2005).

2.2 Qualidade fisiológica de sementes

A qualidade da semente é um fator de extrema importância para que se obtenha a produtividade esperada, e o armazenamento é prática fundamental para o controle da qualidade fisiológica das sementes, sendo um método por meio do qual pode-se preservar a viabilidade das sementes e manter o vigor em nível razoável no período decorrido entre a colheita e o plantio (AZEVEDO *et al.*, 2003).

De acordo com França-Neto *et al.* (2010), a semente possui atributos de qualidades genética, física, fisiológica e sanitária, o que lhe confere a garantia de um elevado desempenho agrônomico, que é a base fundamental do sucesso para uma lavoura tecnicamente bem instalada.

Se bem que, o armazenamento é uma prática muito utilizada pelos produtores no período de entressafra, com o objetivo de preservar a qualidade fisiológica da semente e realizar a semeadura na próxima safra, obtendo uniformidade e melhor produção na lavoura. A qualidade fisiológica das sementes está associada à capacidade de germinação, vigor e longevidade delas. No entanto, durante o processo de armazenamento as principais pragas que atacam o feijão-caupi em armazenamento são: Traça e Caruncho-do-feijão-caupi, porém vem do campo, conhecido como infestação cruzada. A infestação se dar por meio de ovos, lavas ou adultos que com as vagens, grãos ou sacarias, chegam ao armazenamento (SILVA; CARNEIRO; QUINDERÉ, 2005).

2.3 Doenças em sementes de feijão

O cultivo do feijão é uma das principais atividades agrícolas do país. Um dos fatores que limita a produtividade da cultura é a ocorrência de doenças, o que pode causar perdas superiores a 50% na produção ou até mesmo perdas totais, caso não seja empregado o manejo adequado. A obtenção de sementes com elevada qualidade depende da identificação precisa do

momento ideal da colheita, o qual corresponde frequentemente à época em que a maturidade fisiológica é atingida, coincidindo também com o momento de máximo acúmulo de massa seca, elevado vigor e alto potencial de germinação (CARVALHO; NAKAGAWA, 2012).

No Brasil, os fungos constituem um importante grupo de fitopatógenos portadores das mais severas enfermidades associadas às sementes, os quais apresentam influência negativa na produtividade e na qualidade da produção. Entre esses patógenos destacam-se os fungos, que possuem ampla diversidade de espécies. Nos casos de infecção, os fungos normalmente se encontram como micélio dormente no pericarpo e no endosperma da semente, o que lhes garante maior eficiência na sobrevivência e na transmissão para plântulas (CASA, 2005).

Os fungos presentes nas sementes são tradicionalmente divididos em fungos de armazenamento e fungos fitopatogênicos. Os principais representantes do primeiro grupo de fungos são *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. (TORRES; BRINGEL, 2005; RODRIGUES; MENEZES, 2002). Dentre os fungos detectados em sementes de feijão-caupi que apresentam um maior impacto econômico encontram-se *Rhizoctonia* sp., *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium* sp., *Colletotrichum lindemuthianum*, *Curvularia* sp., *Trichoderma* sp., *Alternaria* sp. e *Phoma* sp. (MARQUES *et al.*, 2006).

Segundo Queiroga *et al.* (2012), vários estudos estão sendo realizados no tratamento de sementes com o uso de produtos vegetais, que se caracteriza como uma proposta praticamente inofensiva ao meio ambiente, utilizando-se de óleo, pós e extratos vegetais, e como forma de aplicação o contato, fumigação e impregnação. Tais produtos podem causar repelência, alterar o crescimento, prolongar o desenvolvimento, afetar a reprodução e ocasionar a mortalidade dos insetos-praga. Existem alguns métodos de controle para essas pragas, principalmente, o controle químico que apresenta os inconvenientes de elevado custo e impacto negativo ao meio ambiente, é fato que o uso deste tipo de controle de forma indiscriminada no combate as pragas, coloca em risco o meio ambiente e a saúde dos aplicadores. No entanto, a grande preocupação com o meio ambiente tem levado inúmeros pesquisadores a buscarem alternativas viáveis, efetivas e seguras no controle de insetos-praga. Assim, o uso de compostos químicos extraídos de plantas, é uma alternativa viável por ter baixo custo, ser de fácil preparação e aquisição.

2.4 Gênero *Alternaria*

O gênero *Alternaria* spp., descrito em 1819 por Ness, é composto por fungos anamórficos que apresentam conídios de forma variável, geralmente individuais e raramente

catenulados, retos ou ligeiramente curvos, com corpo oblongo ou elipsoidal que se afina em direção ao ápice, formando um bico comprido, sinuoso e ocasionalmente ramificado (TÖFOLI *et al.*, 2015). São conhecidos por causarem graves perdas a várias culturas e caracterizam-se por infectar sementes, plântulas, folhas, caules, hastes, flores, síliquas e frutos (WOUDENBERG *et al.*, 2013).

As alternarioses estão entre as doenças fúngicas mais comuns e destrutivas do mundo (VERMA; SAHARAN, 1994). O fungo do gênero *Alternaria* tem sido detectado em sementes de feijão e em sementes de diversas culturas, como o trigo (CONAB, 2015), a soja (GOULART, 2004), o arroz (MACEDO, 2002), o coentro (NASCIMENTO *et al.*, 2006), o algodoeiro (PIZZINATTO *et al.*, 2005).

Muitas doenças já foram descritas no Brasil, porém, as de ocorrência mais comum e que têm causado maiores danos à cultura são: a antracnose, a mancha-de-alternaria também conhecida como mancha-parda e a mancha-angular (PAULA JR. *et al.*, 2004).

2.4.1 *Alternaria alternata*

A *Alternaria alternata* é um fungo comumente encontrado infestando ou/e infectando sementes. Essa associação pode ocorrer através de infecções das inflorescências, resultando na maioria dos casos, em morte das sementes ou na infecção posterior em plântulas. Mesmo sendo considerado um patógeno fraco, pode produzir grandes prejuízos, pelo fato de ser transmitido por semente (NEERGAARD, 1979). Jajor *et al.* (2012), relata que esta espécie tem capacidade de produzir micotoxinas, as quais podem afetar a qualidade do produto (óleo vegetal) a partir das sementes contaminadas.

No feijoeiro a mancha de *Alternaria* é uma doença considerada de importância secundária, porém tem se mostrado bastante destrutiva em algumas áreas de cultivo intensivo sob pivô. Pode ser causada por mais de uma espécie de *Alternaria*, sendo a semente uma das principais fontes de inóculo da doença. (MENEZES, 1995).

2.5 Óleos essenciais

Os óleos essenciais são constituídos por substâncias voláteis presentes em várias partes das plantas que desenvolvem papel fundamental na defesa contra microrganismos e predadores. De um modo geral, classificam-se como misturas complexas, que podem ser denominadas

quanto à composição lipofílica, geralmente odorífera e líquida. Quimicamente, em sua maioria são constituídos de terpenóides e derivados fenilpropanóides. Na composição de óleos voláteis, podem ser encontrados em diferentes concentrações os seguintes grupos químicos: hidrocarbonetos insaturados, álcoois, aldeídos, cetonas, lactonas, tropolonas, entre outros. Alguns derivados terpenóides são: linalol, geraniol, α -pineno, mentol e carvona. Enquanto alguns derivados fenilpropanóides são: o eugenol e o aldeído cinâmico (SIMÕES, 2007).

Os óleos essenciais estão presentes em diversas partes das plantas, como por exemplo: raízes, rizomas, folhas, flores, frutos, sementes e cascas. Dependendo da planta a extração pode ser um processo demorado e custoso (BIZZO, 2013). É necessária a preparação do solo, plantio em época e local de clima adequado, e tratos culturais cuidadosos até a extração. Por essa razão, o processo e conseqüentemente o óleo obtido pode ter um custo elevado.

Segundo Silva *et al.*, (2009), a busca pela utilização dos óleos essenciais é considerada uma fonte natural para o desenvolvimento de novos produtos. E, nos últimos tempos, vem sendo descoberto novos compostos químicos de diferentes plantas, capazes de controlar o desenvolvimento de fitopatógenos. Com isso, o uso indiscriminado desses produtos químicos, empregados no tratamento de sementes, além de contaminar o meio ambiente, acarretando riscos para a sociedade, tem provocado falhas de controle decorrente do surgimento de microrganismos resistentes. Dessa forma, o uso de óleos essenciais na agricultura ainda requer muitos estudos, mas constitui reflexo da preocupação ambiental, bem como com a saúde pública e, portanto, o seu emprego no tratamento de sementes surge como alternativa ao uso de produtos químicos (GONÇALVES; MATTOS; MORAIS, 2009)

Deste modo, tem-se o trigo (*Triticum aestivum* L.) (RODRIGUES *et al.*, 2006), a soja (*Glycine max* L.) (GONÇALVES *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2012), o milho (*Zea mays* L.), o feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) (HILLEN *et al.*, 2012) e o sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) (FLÁVIO *et al.*, 2014).

2.5.1 Óleo de *Melaleuca alternifolia*

A melaleuca é uma espécie arbórea da família Myrtaceae denominada cientificamente de *Melaleuca alternifolia*. Esta árvore é nativa da Austrália, mas que cultivada no Brasil apresentando as mesmas características da australiana (VIEIRA *et al.*, 2004). Popularmente conhecida como “árvore de chá” (do inglês Tea Tree), a melaleuca floresce principalmente em áreas de pântano, próximas de rios. O seu principal produto é o óleo essencial, o qual possui

uma grande importância, devido a seu efeito antimicrobiano e anti-inflamatório (BENELLI *et al.*, 2013).

Segundo Martins *et al.* (2010), a constituição química do óleo essencial de melaleuca é rica em α -terpineno, γ -terpineno, 1,8-cineol e terpinen-4-ol. Onde o terpinen-4-ol é o principal responsável pelas propriedades medicinais do óleo, especialmente as antimicrobianas, apresentando concentração acima de 30% (SIMÕES *et al.*, 2002; GARCIA *et al.*, 2009; CARSON *et al.*, 2006) conforme (tabela 1). Em relação à dosagem de fabricação, a composição do óleo é regulamentada pela ISSO 4730 (MARTINS *et al.*, 2010).

Foi obtido pela primeira vez em 1925 por Arthur Penfold, curador do Museu Australiano de Artes e Ciências Aplicadas, que o destilou e avaliou suas propriedades germicidas com ampla ação bacteriana e antifúngica (HAMMER *et al.*, 2006). Durante a segunda guerra mundial, os soldados Australianos utilizavam o óleo de melaleuca em grandes quantidades como agente antisséptico de forma tópica para o tratamento de feridas. O óleo de melaleuca é empregado como agente antimicrobiano ou preventivo tanto em cosméticos quanto em fármacos (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Os métodos de obtenção de óleos essenciais variam de acordo com a matriz da qual será extraído o óleo, e os mais comuns são: destilação por arraste de vapor, enfloração, extração com solventes orgânicos, CO₂ supercrítico e prensagem (SIMÕES; SPTIZER, 2004).

Pode ser apresentado na forma hidrossolúvel e lipossolúvel. Hidrossolúvel é a característica dos produtos que podem ser dissolvidos em água. Assim, o óleo essencial de melaleuca pode ser desenvolvido para formulações límpidas por se tratar de uma microemulsão aquosa sob a forma de gel antiacne, sabonete líquido antibacteriano ou gotas. Já a versão lipossolúvel, por se tratar de substância altamente solúvel na presença de lipídeos e gorduras, além da indicação para o tratamento da acne, pode ser utilizada como antisséptico e antifúngico na forma de sabonete e loção (DE SANTI, 2003).

Este tipo de composto apresenta uma extensa gama de vantagens no controle de fitopatógenos quando comparados com produtos sintéticos quimicamente formulados. Dos produtos alternativos, o óleo de melaleuca (*Melaleuca alternifolia* Cheel) tem merecido atenção especial pelos pesquisadores (LEMOS *et al.*, 2012), devido a sua eficiência no controle de fitopatógenos (MARTINS *et al.*, 2010; HOYOS *et al.*, 2012), por meio da sua atividade bacteriostática e fungistática frente aos microrganismos.

Tabela 1. Principais componentes do óleo de Melaleuca

Componente	Composição (%)	
	ISO 4730 ^a	Composição típica
Terpinen-4-ol	=30 ^b	40,1
γ -Terpineno	10-28	23,0
α -Terpineno	5-13	10,4
1,8-Cineole	=15 ^c	5,1
Terpinoleno	1,5-5	3,1
ρ -Cymene	0,5-12	2,9
α -Pinene	1-6	2,6
α -Terpineol	1,5-8	2,4
Aromadendrene	Mínimo-7	1,5
δ -Cadinene	Mínimo-8	1,3
Limoneno	0,5-4	1,0
Sabineno	Mínimo-3,5	0,2
Globulol	Mínimo-3	0,2
Viridiflorol	Mínimo-1,5	0,1

^a ISO 4730, Organização Internacional para Padronização. ^b Nenhum limite superior está definido, embora 48% seja o proposto. ^c Nenhum limite inferior está definido.

Fonte: Carson *et al.* (2006).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local dos experimentos e obtenção dos materiais

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia do Centro de Ciências e Tecnologia Agroalimentar (CCTA), da Universidade Federal de Campina Grande, Campus de Pombal. Os experimentos foram realizados no período de fevereiro de 2018 a fevereiro de 2019.

Para a realização dos experimentos, utilizamos o isolado fúngico 0878 de *Alternaria alternata* cedido pela coleção de cultura de fungos fitopatogênicos Profa. Maria Menezes da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), o qual foi preservado até a realização do ensaio em água destilada estéril pelo método Castellani (CASTELLANI, 1967).

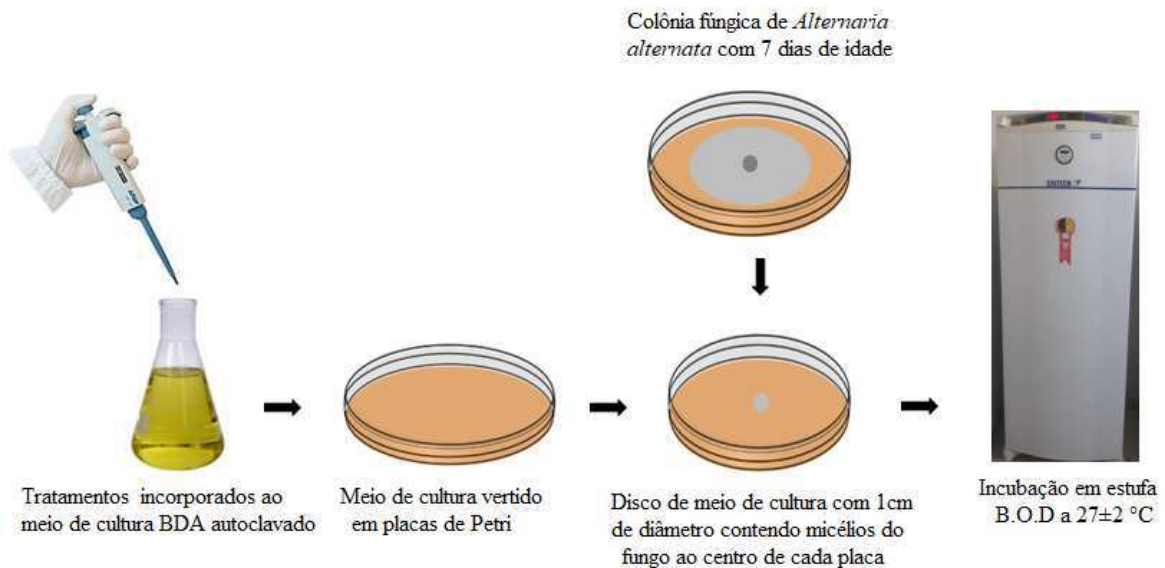
O óleo essencial de melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) foi comprado em uma loja de produtos naturais. As sementes de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.), utilizadas no experimento in vivo, foram adquiridas no comércio local do município de Patos, Paraíba.

3.2 Efeito do óleo essencial de melaleuca sobre *Alternaria alternata in vitro*

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com 11 tratamentos em quatro repetições cada. Os tratamentos consistiram no meio de cultura suplementado com óleo essencial de melaleuca em nove concentrações (0,0125; 0,025; 0,1; 0,2; 0,5; 0,25; 0,50; 0,75 e 1,0%); uma testemunha negativa (meio de cultura sem suplementação = 0,0%), e uma testemunha positiva (meio de cultura suplementado com 1 mL L⁻¹ com o fungicida Thiram, que é a dose recomendada pelo fabricante). As concentrações do óleo essencial foram estabelecidas a partir de uma concentração baseada na literatura (CONCHA et al., 1998; MARTINS et al., 2010), e então reduzidas gradativamente até que a adição de óleo não fosse mais capaz de impedir o crescimento fúngico.

Os diferentes tratamentos foram incorporados ao meio de cultura BDA (Batata Dextrose Ágar) fundente à temperatura de 46-48°C. Após o resfriamento, o meio foi vertido em placas de Petri em condições assépticas. Discos de meio de cultura com 1 cm de diâmetro contendo micélios do fungo foram transferidos para o centro de cada placa contendo cada um dos tratamentos. Em seguida, as placas foram envolvidas em plástico filme e incubadas durante sete dias em estufa do tipo B.O.D (*Biochemical Oxygen Demand*) à temperatura de 27±2°C (Figura 1).

Figura 1. Procedimentos de incorporação dos tratamentos ao meio de cultura e inoculação de *Alternaria alternata*.



Fonte: Autoria própria

O crescimento das colônias foi mensurado diariamente até que a colônia tomasse toda a superfície do meio de cultura em uma das placas da testemunha negativa. As medições diárias do diâmetro das colônias consistiram na média de duas medidas perpendiculares realizadas com o auxílio de régua graduada. Com o resultado das medidas, foram calculados a porcentagem de inibição micelial (PIC; BASTOS, 1997) e o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM; OLIVEIRA, 1991), de acordo com as fórmulas (1) e (2):

$$PIC = \frac{(\text{Crescimento da testemunha} - \text{Crescimento do tratamento}) \times 100}{\text{Crescimento da testemunha}} \quad (1)$$

$$IVCM = \sum \frac{\text{Diâmetro médio atual} - \text{Diâmetro médio anterior}}{\text{Número de dias após a inoculação}} \quad (2)$$

A concentração mínima inibitória foi considerada como sendo a menor concentração do óleo capaz de inibir em 100% o crescimento micelial de *Alternaria alternata*.

3.3 Efeito do óleo essencial de melaleuca sobre *Alternaria alternata* em sementes de feijão-caupi

O delineamento experimental empregado foi o inteiramente casualizado (DIC) com 6 tratamentos em 10 repetições cada. Os tratamentos que consistiram em soluções à base de água destilada esterilizada foram suplementados com o óleo essencial de melaleuca em 4 concentrações (0,2; 0,5; 1,0 e 5,0%), uma testemunha negativa (0.0%) e uma testemunha positiva (fungicida comercial Thiram na dose de 1 mL L⁻¹). As concentrações utilizadas foram determinadas com base no teste *in vitro*. Para permitir a emulsão entre óleo e a água, empregou-se o Tween 80 (1 mL L⁻¹) em todos os tratamentos (SANTOS, 2018).

As sementes de feijão-caupi foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio a 2% durante cinco minutos, lavadas em água destilada estéril duas vezes, e secas em temperatura ambiente. Após a secagem, realizou-se a inoculação artificial com o fungo *Alternaria alternata*, a qual foi realizada através da deposição das sementes tratadas sobre colônias com 7 dias de idade. O tempo de contato entre as sementes e as colônias fúngicas foi de 48 horas em estufa do tipo B.O.D à temperatura de 27±2°C, com fotoperíodo de 12 horas (SILVA; SILVA, 2000).

Após o tratamento e inoculação, as sementes foram submetidas ao teste de sanidade pelo método de papel filtro com congelamento (LIMONARD, 1966). Foram utilizadas 600 sementes de feijão-caupi (100 por tratamento), distribuídas em placas de Petri (Ø = 14 cm). Dez sementes foram distribuídas equidistantes em cada placa, sobre camada tripla de papel filtro umedecido com água destilada estéril, e incubadas inicialmente por 24 horas a 27±2 °C com fotoperíodo de 12 horas. Após esse período, as sementes foram submetidas ao congelamento (-20°C) por 24 horas e, posteriormente, retornadas à estufa de incubação por mais cinco dias.

Após a incubação, as sementes foram avaliadas individualmente, com o auxílio do microscópio estereoscópico para a quantificação das sementes infectadas por *Alternaria alternata*. Os resultados foram expressos em porcentagem de sementes infectadas.

3.4 Análise estatística

O efeito da concentração do óleo sobre o crescimento dos fungos foi analisado utilizando-se regressões em modelo platô quadrático para o experimento *in vitro* e em modelo linear para o experimento *in vivo*. As regressões foram realizadas no programa R CoreTeam 3.5.1.

Com o objetivo de testar a diferença entre os tratamentos com óleo e os tratamentos com fungicidas (testemunhas positivas), aplicamos a comparação múltipla de Mann-Whitney (Tukey não paramétrico). Utilizamos estatística não paramétrica devido ausência de variância nos resultados de alguns tratamentos. Foram consideradas significantes, as diferenças com valor de probabilidade abaixo de 5%. Os testes de Mann-Whitney foram realizados no programa Past 3.12 (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001).

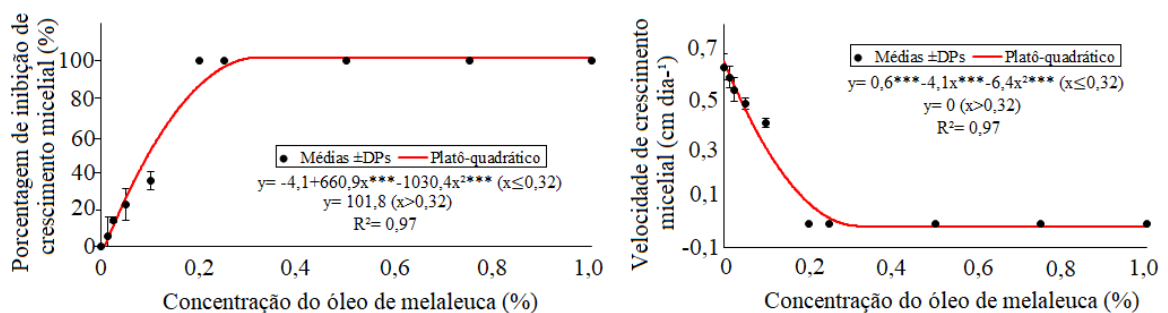
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Efeito do óleo essencial de melaleuca sobre *Alternaria alternata*

Todas as concentrações do óleo essencial de melaleuca exerceram inibição sobre o crescimento micelial e velocidade de crescimento de *Alternaria alternata* (Figura 1). As porcentagens de inibição tiveram aumento significativo com as concentrações testadas ($p < 0,001$), até atingirem o seu valor máximo (PIC=100%) a partir da concentração de 0,2%, sendo essa a concentração mínima inibitória (CMI). Por outro lado, aplicando-se a equação de regressão em modelo platô quadrático, a concentração mínima estimada (CMest) foi de 0,33%.

Por se tratar de uma variável inversamente proporcional à porcentagem de inibição, a velocidade de crescimento apresentou comportamento contrário, havendo redução significativa com as concentrações testadas do óleo ($p < 0,001$). A velocidade de crescimento foi reduzida mais efetivamente a partir da concentração de 0,2%, na qual observou-se a paralisação do crescimento (IVCM=0,00 cm dia⁻¹), diferindo da testemunha negativa, que apresentou a maior velocidade de crescimento (0,63 cm dia⁻¹).

Figura 2. Efeito das concentrações do óleo essencial de melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) sobre o crescimento micelial de *Alternaria alternata*



(*** $p < 0,001$)

Análises dos constituintes químicos do óleo têm evidenciado o terpinenol (terpinen-4-ol) como constituinte majoritário, o qual está associado ao elevado potencial fungitóxico do óleo essencial de melaleuca (HAMMER *et al.*, 2012). Um dos mecanismos de ação antifúngica do óleo essencial de melaleuca é a alteração na permeabilidade e fluidez das membranas celulares dos microrganismos. Como esses organismos são permeáveis ao óleo, os principais efeitos encontrados são a inibição da respiração celular e a alteração na estrutura e integridade

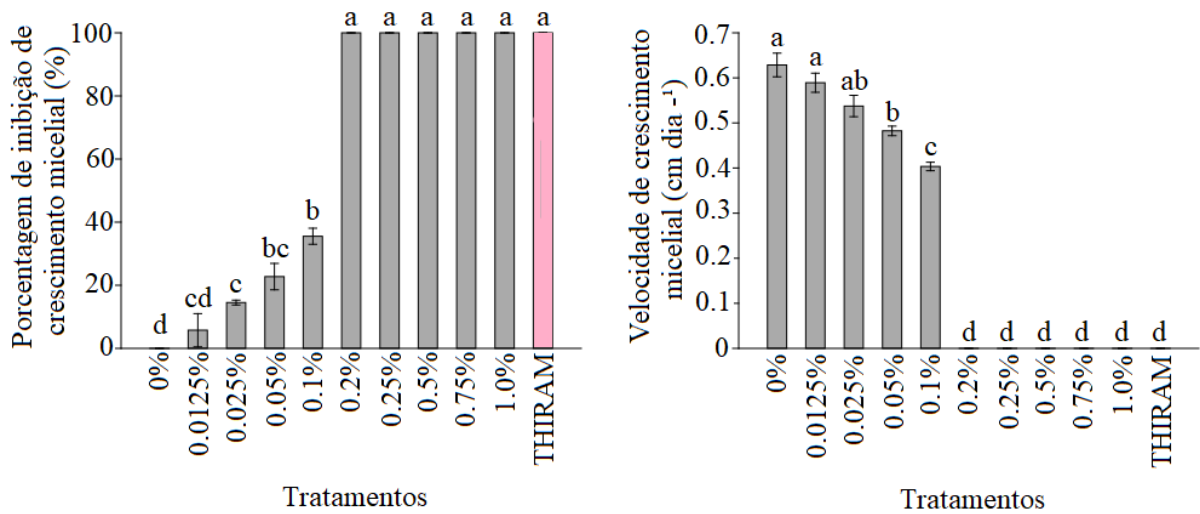
das membranas, bem como vazamento dos materiais intracelulares essenciais. Esses eventos causam a inibição do crescimento ou até a morte celular (HAMMER *et. al.*, 2004; AZEVEDO, 2010).

Utilizando o óleo de melaleuca em concentrações próximas ou superiores às nossas, outros autores obtiveram resultados semelhantes quanto a inibição. Por exemplo, Martins *et al.* (2019) obtiveram inibição total no crescimento de *Macrophomina phaseolina* e *Sclerotinia sclerotiorum* a partir da concentração de 0,2%. Enquanto no controle de *Alternaria radicina* e *A. dauci*, Riccioni e Orzali (2011) obtiveram inibição total do crescimento micelial a partir da concentração de 0,5%.

Utilizando óleos essenciais de outras espécies vegetais no controle de *A. alternata*, outros autores obtiveram tanto os resultados similares, quanto superiores ou inferiores aos nossos. A inibição total do crescimento micelial foi obtida por Chutia *et al.* (2009), Guimarães *et al.* (2011) e Barboza (2015) ao utilizarem os óleos essenciais de tangerina (*Citrus reticulata*), capim-limão (*Cymbopogon citratus*) e alecrim-da-chapada (*Lippia gracilis*), a partir das concentrações 0,2 mL/100mL (0,2%), 14,49 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (0,0014%) e 750 $\mu\text{L L}^{-1}$ (0,075%), respectivamente. Por outro lado, utilizando o óleo essencial de hortelã (*Mentha piperita*), França *et al.* (2018) obtiveram inibição máxima de 41,6% na concentração de 0,8%. Sendo assim, tanto o potencial fungitóxico de óleos essenciais sobre *A. alternata*, bem como as suas concentrações inibitórias mínimas irão variar conforme a espécie vegetal da qual o óleo essencial foi extraído (ANTUNES; CAVACOB, 2010). Além disso, o aumento do poder inibitório em função do aumento da concentração pode tanto potencializar o efeito, como gerar desperdício do produto.

Tendo em vista possíveis aplicações antifúngicas do óleo essencial de melaleuca sobre *A. alternata*, o seu potencial fungitóxico foi comparado ao obtido pelo fungicida sintético Thiram. Como resultado, observou-se que o óleo na CMI (0,2%) apresentou efeito similar ao obtido pelo fungicida comercial, sugerindo que, em condições *in vitro*, o óleo poderia substituir a utilização desse agroquímico.

Figura 3. Porcentagem de inibição de crescimento de *Alternaria alternata* em diferentes concentrações do óleo essencial de melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) e nos tratamentos testemunha.



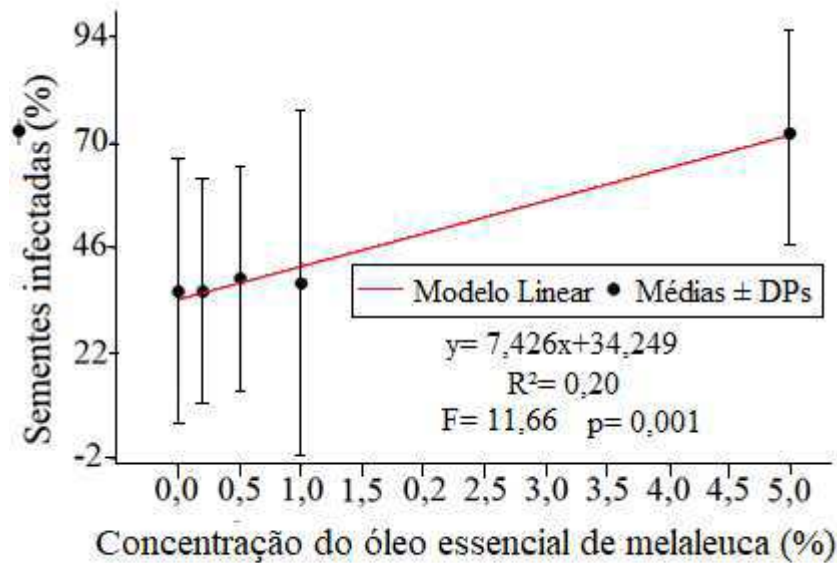
As concentrações sobrescritas com a mesma letra não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Mann-Whitey ($p > 0,05$).

Em razão da complexidade química, o controle antifúngico promovido pelos óleos essenciais está associado aos seus diferentes constituintes (RUSSO *et al.*, 2013) através de mecanismos diversos de ação, que atuam de forma simultânea em diversos alvos (ABDEL-KADER; EL-MOUGY; LASHIN, 2011). Essas características peculiares garantem vantagem em relação ao fungicida sintético, uma vez que estes reduzem a possibilidade de surgimento de resistência por parte dos fitopatógenos (FENG; ZHENG, 2007).

4.2 Efeito do óleo essencial de melaleuca sobre *Alternaria alternata* em sementes de feijão-caupi

De forma contrária ao observado nos testes *in vitro*, no tratamento de sementes, o óleo essencial de melaleuca foi ineficaz no combate à incidência de *A. alternata*. O aumento das concentrações não promoveu redução no número de sementes infectadas pelo fitopatógeno ($p < 0,001$; Figura 3).

Figura 4. Efeito das diferentes concentrações do óleo essencial de melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) sobre a incidência de sementes de feijão-caupi infectadas por *Alternaria alternata*

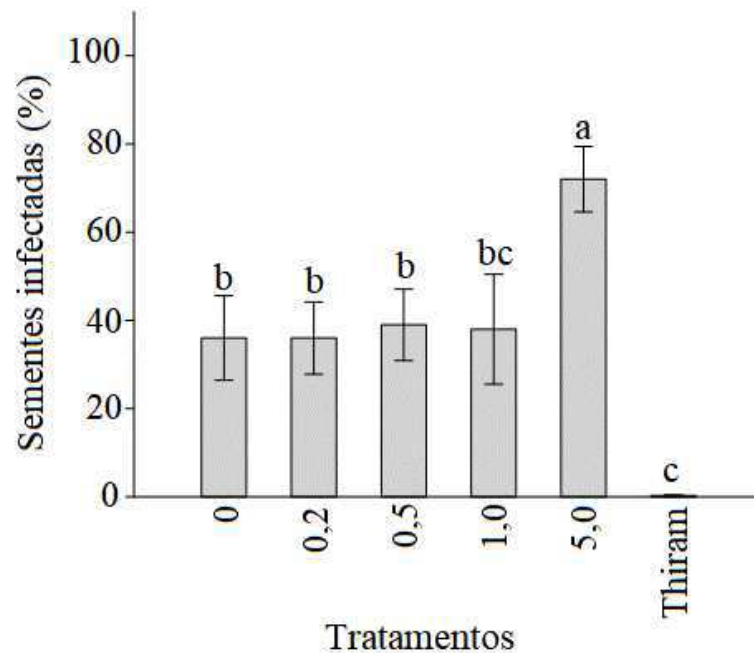


A incidência de sementes infectadas em todas as concentrações do óleo foi superior à testemunha negativa (tratamento sem a adição de óleo). Uma das hipóteses levantadas pelos autores é de que o óleo essencial não tenha aderido à superfície das sementes em razão da alta volatilização de seus constituintes. Assim, durante o período de incubação alguns constituintes podem ter evaporado e reduzido à sua capacidade antimicrobiana.

Khalili et al. (2015) ressaltam que a formação dos óleos por compostos voláteis, e sua subsequente degradação, pode ser influenciada pela temperatura ambiente. De acordo com Simões e Spitzler (2004) e Rozwalka *et al.* (2008), a volatilização dos constituintes dos óleos, assim como sua instabilidade na presença da luz, calor e umidade, modificam a atmosfera no interior das placas de Petri, levando à perda da eficácia de um óleo que, sobre outras condições inibiu o crescimento fúngico.

O efeito do óleo essencial de melaleuca sobre a incidência de sementes infectadas foi inferior ao fungicida Thiram em todas as concentrações testadas (Figura 4). Entre as concentrações 0,2 e 1%, o óleo não diferiu significativamente da testemunha negativa ($p > 0,05$), enquanto na concentração de 5% a incidência de sementes infectadas aumentou para 80%. Por outro lado, o tratamento contendo o fungicida Thiram impediu o desenvolvimento do fitopatógeno nas sementes.

Figura 5. Porcentagem de sementes de feijão-caupi infectadas por *Alternaria alternata* após o tratamento com diferentes concentrações do óleo essencial de melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) e nos tratamentos testemunha



No presente estudo, apesar do óleo essencial de melaleuca não ter proporcionado resultados satisfatórios no experimento *in vivo*, ressalta-se que a sua utilização no controle de outros fitopatógenos foi bem-sucedida. Mondego et al. (2014), ao tratar sementes com o óleo essencial de embiratanha (*Pseudobombax marginatum*), relataram que a concentração de 1,5% reduziu de forma eficaz o crescimento dos fungos *Aspergillus* sp., *Chaetomium* sp. e *Curvularia* sp. sem afetar a qualidade fisiológica das sementes. Morais et al. (2008), ao utilizarem sementes de feijão cariquinho com os óleos de capim-limão (*Cymbopogon flexuosus* e *C. citratus*) e melaleuca (*Melaleuca* sp.), reduziram de forma significativa a incidência de sementes infectadas por *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. Enquanto que, Wanderley et al. (2009) comprovaram a eficácia dos óleos essenciais de citronela (*Cymbopogon* sp.) erva-doce (*Pimpinella anisum*) e alfavaca (*Ocimum basilicum*) na concentração de 1,5% sobre *Callosobruchus maculatus*, em sementes de feijão manteiguinha.

Finalmente, apesar da ineficácia do óleo de melaleuca no tratamento de sementes de feijão 'Caupi' infectadas com *A. alternata*, este óleo pode ser útil no tratamento de outras sementes e outros patógenos. Os óleos essenciais apresentam baixo risco ao ambiente, produtores e consumidores, além de dificultarem o desenvolvimento de resistência do patógeno (DERBAHLAH et al., 2012). Assim, são necessários mais estudos sobre a utilização destes óleos no manejo de fitopatógenos, para torná-los uma alternativa viável para os produtores rurais.

5 CONCLUSÕES

- No experimento *in vitro*, o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* inibiu 100% do crescimento micelial de *Alternaria alternata* a partir da concentração de 0,2%, apresentando efeito semelhante ao fungicida sintético thiram;
- No experimento *in vivo*, o óleo essencial de *M. alternifolia* não foi capaz de reduzir a incidência de *A. alternata* em sementes de feijão-caupi, e os parâmetros utilizados podem não ter sido os adequados, sendo necessário realizar novos experimentos.

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.
- ANTUNES, M.D.C.; CAVACOB, A.; The use of essential oils for postharvest decay control. A review. **Flavour Fragrance Journal**. v.25, p.351-366, 2010.
- ATHAYDE SOBRINHO, C. **Doenças fúngicas e bacterianas**. In: FREIRE FILHO, F.R.; LIMA, J. A. A. RIBEIRO, V.Q. Feijão Caupi: Avanços tecnológicos. Brasília-DF: EMBRAPA, 2005.
- ATHAYDE SOBRINHO, C.; VIANA, F.M.P.; SANTOS, A.A. dos. Doenças fúngicas e bacterianas. In: FREIRE FILHO, F.R.; LIMA, J.A.A.; RIBEIRO, V. Q. **Feijão-caupi: avanços tecnológicos**. (EDIÇÃO) Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, capítulo 12, p.461-484, 2005.
- ATHAYDE SOBRINHO,C.; VIANA, F.M.P.; FREIRE FILHO, F.R.; MORAES, S.M.D. **Microorganismos associados às sementes de feijão caupi com ênfase à presença de *Macrophomina phaseolina***. Teresina: Embrapa, CPAMN. 2004. 8p. (Embrapa CPAMN. Comunicado Técnico, 88).
- AZEVEDO, F.A. *et al.* Resposta de diferentes genótipos de tangerinas e seus híbridos à inoculação *in vitro* e *in vivo* de *Alternaria alternata*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.32, p.1-8, 2010.
- AZEVEDO, M.R.Q. et al. Influência das embalagens e condições de armazenamento no vigor de sementes de gergelim. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.7, n.3, p.519-524, 2003.
- BARBOZA, H.S. Efeito fungitóxico do óleo essencial de alecrim-da-chapada em *Alternaria* sp. 2015. 31fls. **Trabalho de Conclusão de Curso** (Graduação em Agronomia) – Universidade Federal do SemiÁrido, Mossoró, RN, Brasil. 2015.
- BASTOS, C.N. Efeito do óleo de *Piper aduncum* sobre *Crinipelis pernicioso* e outros fungos fitopatogênicos. **Fitopatologia Brasileira**, v.22, n.3, p.441–3, 1997.

BASTOS, E.A. **Cultivo de feijão-caupi**. 2. ed. Brasília, DF: Embrapa, 2017. Versão eletrônica. (Embrapa Meio-Norte. Sistema de produção, 2; Embrapa Amazônia Ocidental. Sistema de produção, 2; Embrapa Agrobiologia. Sistema de produção).

BENELLI, G. et al. Biototoxicity of *Melaleuca alternifolia* (Myrtaceae) essential oil against Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata* (Diptera: Tephritidae), the its parasitoid *Psytalia concolor* (Hymenoptera: Braconidae). **Industrial Crops and Products**, n.1, v.50, p.596-603, 2013.

BIANCHINI, A.; MARINGONI, A. C.; CARNEIRO, S. M. T. P. G. **Doenças do feijoeiro**. In: KIMATI, H.; AMORIN, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Ed.). Manual de fitopatologia. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v.2, p. 333-349. 2005.

BIZZO, H. R. et al. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química. Nova**, n.32, n.3, p.588-594, 2013.

BRUM, R. Efeito de óleos essenciais no controle de fungos fitopatogênicos. 2012. 135 fls. **Dissertação** (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Federal do Tocantins (UFT). Gurupi, TO, Brasil. 2012.

CANDIDO E SILVA, E.K.; MELO, L.G.L. Manejo de doenças de plantas: Um enfoque agroecológico. **Revista EDUCAmazônia–Educação Sociedade e Meio Ambiente**. v.10, n.1, p.143-157, 2013.

CARSON, C.F.; HAMMER, K.A.; 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, N.M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: Ciência, tecnologia e produção**. 5.ed. Jaboticabal: FUNEP, 590p, 2012.

CASA, R.T.; REIS, E.M.; MOREIRA, E.M. Transmissão de fungos em sementes de cereais de inverno e milho: implicações epidemiológicas. In: Zambolin L (Ed.) **Sementes: qualidade fitossanitária**. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa. p.55-74, 2005.

CASTELLANI A. Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. Further Researches. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.70, p.181–184, 1967.

CHUTIA, M. *et al.* Antifungal activity and chemical composition of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against phytopathogens from North East India. **LWT - Food Science and Technology**, v.42, p.777-780, 2009.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento de safra brasileira: Grãos. In: **Décimo primeiro levantamento, agosto 2015**. Brasília, 2015. v.2, n.11, p.1-101.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento de safra brasileira**. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/Olala/uploads/arquivos/17_09_06_09_30_08_perspectivas_da_agropecuaria_bx.pdf> Acesso em: 05 fev. 2019.

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.489-92, 1998.

DE SANTI, E. **Dicionário de princípios ativos em cosmetologia**. São Paulo: Andrei, 2003.

DERBAHLAH, A.S. HHAMZA, A.M.; GAZZY A, A. Efficacy and safety of some plant extracts as alternatives for *Sitophilus oryzae* control in rice grains. **Journal of Entomology**. v. 9, p.57-67.2012.

EMBRAPA ARROZE FEIJÃO. Dados de conjuntura da produção de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) e caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) no Brasil (1985 a 2017). Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_11_22_15_51_58_feijao_-_semana_-_46_-_13_a_17.pdf> Acesso em: 05 fev. 2019 Santo Antônio de Goiás, 2018.

FAO. **Crops**. 2018. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>>, Acesso em: 29 fev. 2019.

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

FERNANDES, C.F.; **Principais doenças e pragas do feijão-de-corda**. Embrapa/ CPAFRO. 2005. Disponível em: <<http://www.agronline.com.br/artigos/artigo.phpid=294>>. Cléberson de Freitas Fernandes> Acesso em: 17 mai. 2018.

FLÁVIO, N.S.D.S. et al. Qualidade sanitária e fisiológica de sementes de sorgo tratadas com extratos aquosos e óleos essenciais. **Semina: Ciências Agrárias**, v.35, n.1, p.7-20, 2014.

FRANÇA, K. R. S. et al. *In vitro* Effect of essential oil of peppermint (*Mentha x piperita* L.) on the mycelial growth of *Alternaria alternata*. **Journal of Experimental Agriculture International**, v.26, n.5, p.1-7, 2018.

FRANÇA-NETO, J.B.; KRZYZANOWSKI, F.C.; HENNING, A.A. A importância do uso de semente de soja de alta qualidade. **Informativo ABRATES**, v.20, n.1,2, p.37-38, 2010.

FREIRE FILHO, F.R. **Feijão-caupi no Brasil: produção, melhoramento genético, avanços e desafios**. Embrapa Meio-Norte, Teresina, 84 p., 2011.

GARCIA, C.C. et al. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade físico-química de formulações de sabonete líquido íntimo acrescidas de óleo de Melaleuca. **Revista Brasileira de Farmacognisia**, v.90, n.3, p.236-240, 2009.

GONÇALVES, G.G.; MATTOS, L.P.V.; MORAIS, L.A.S. Óleos essenciais e extratos vegetais no controle de fitopatógenos de grãos de soja. **Horticultura Brasileira**, v.27, n.2, p.102-107, 2009.

GONÇALVES, G.G.; MATTOS, L.P.V.; MORAIS, L.A.S. Óleos essenciais e extratos vegetais no controle de fitopatógenos de grãos de soja. **Horticultura Brasileira**, v.27, n.2, p.102-107, 2009.

GOULART, A.C.P. **Fungos em sementes de soja: Detecção, importância e controle**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2004. 72p

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

HALL, R. Compendium of bean diseases. St. Paul: American Phytopathological Society, 73 p, 1994.

HAMMER, K.A, et al., 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, K.A.; CARSON, C.F.; RILEY, T.V., Effects of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) essential oil and the major monoterpene component Terpinen-4-ol on the development of single and multistep antibiotic resistance and antimicrobial susceptibility. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v,52, n.2, p.909-915, 2012.

HAMMER, O.; HARPER, D.A.T.; RYAN, P.D. Past: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Paleontologia Electronica**. v.4, n.1, p.9, 2001.

HILLEN, T. et al. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais no controle de alguns fitopatógenos fúngicos in vitro e no tratamento de sementes. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.14, n.3, p.439-445, 2012.

HILLEN, T. et al. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais no controle de alguns fitopatógenos fúngicos in vitro e no tratamento de sementes. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.14, n.3, p.439-445, 2012.

HOYOS, J.M.A. et al. Antifungal activity and ultrastructural alterations in *Pseudocercospora griseola* treated with essential oils. **Ciência e Agrotecnologia**, v.36, n.3, p.270-284, 2012.

JAJOR, E.; KOZLOWSKA, M.; WOJTOWICZ, M. Prevalence of fungi of the genus *Alternaria* on rape siliques and seeds depending on weather conditions. **Progress in Plant Protection**, v.52, n.4, p.1011-1015, 2012.

LEMOS, D.R.H. et al. Influence of drying air temperature on the chemical composition of the essential oil of melaleuca. **Engenharia na Agricultura**, v 20, n.1, p.5-11, 2012.

MACEDO, E.C.; GROTH, D.; SOAVE, J. Influência da embalagem e do armazenamento na qualidade sanitária de sementes de arroz. **Revista Brasileira de Sementes**, v.24, n.1, p.42-50, 2002.

MACHADO, J.C. Patologia de Sementes: Significado e Atribuições. In: CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: Ciências, Tecnologia e Produção**. Jaboticabal: Funep, p. 524-582. 2012.

- MARQUES, R.O.; ALVES, V.M.; LIMA,M.L.P.;ARRUDA,G.M.T. Avaliação sanitária e fisiológica de feijão oriundos de Unaí – MG, Paracatu-MG e Cristalina- GO. **Summa Phytopathologica**, v.32, (Suplemento), p.44, 2006.
- MARTINS, E.S.C.S. et al. Efeito dos óleos essenciais de citronela, alecrim e erva-cidreira no controle *in vitro* de *Ralstonia solanacearum* em pimentão. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v.4, n.1, p.09-13, 2010.
- MARTINS, J.A.S. et al. Avaliação do efeito do óleo de *Melaleuca alternifolia* sobre o crescimento micelial *in vitro* de fungos fitopatogênicos. **Bioscience Journal**, v.27, n.1, p.49-51, 2010.
- MENEZES, J.R. Controle integrado de doenças em culturas irrigadas por pivô central. In: **Congresso Brasileiro de Fitopatologia**, 1995, Ilhéus. Fitopatologia Brasileira, Brasília, v.20, Suplemento, p.207-208, 1995.
- MENEZES, M.; OLIVEIRA S.M.A. **Fungos fitopatogênicos**. Recife: UFRPE, Imprensa Universitária; 1993. 277 p.
- 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. et al. Atividade antifúngica dos óleos essenciais em sementes de feijão cv. Carioquinha. **Horticultura Brasileira**, v.26, n.2, p. 6261-6266, 2008.
- KHALILI, S.T. et al. Encapsulation of Thyme essential oil in chitosan-benzoic acid nanogel with enhanced antimicrobial activity against *Aspergillus flavus*. **Food Science and Technology**, v.60, n.1, p.502-508, 2015.
- LIMONARD, T. A modified blotter test for seed health. **Netherland Journal of Plant Pathology**, v.72, n.2, p.319-321, 1996.
- NASCIMENTO, W.M. et al. Colheita e armazenamento de sementes de coentro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.12, p.1793-1801, 2006.

NECHET, K.L.; HALFELD-VIEIRA, B.A. Caracterização de isolados de *Rhizoctonia* spp., associados à mela do Feijão-Caupi (*Vigna unguiculata*), coletados em Roraima. **Fitopatologia Brasileira**, v.31, p.505-508, 2006.

NEERGAARD, P. **SEED PATHOLOGY .LONDON:** The Mac Millan Press, v.2, 1979.

NEVES, A. C. et al. Cultivo do feijão-caupi em sistema agrícola familiar. Teresina- PI: Embrapa Meio Norte, 2011, 15p. (Embrapa Meio Norte. Circular Técnica, 51).

OLIVEIRA, A. C. M. et al. Emprego do óleo de *Melaleuca alternifolia* Cheel (Myrtaceae) na odontologia: perspectivas quanto à utilização como antimicrobiano alternativo as doenças infecciosas de origem bucal. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.13, n.4, p.492-499 2011.

OLIVEIRA, J. T. S. Seleção de genótipos tradicionais e melhorados de feijão caupi adaptados a região semiárida Piauiense 2008. 67f. **Dissertação** (Mestrado Produção vegetal) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2008.

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

PAULA JR. T.J., VIEIRA, R.F., ARAÚJO, G.A.A. 2004. Manejo integrado de doenças do feijoeiro do plantio direto. In: ZAMBOLIM, L. SILVA, A.A., AGNES, E.L. **Manejo integrado: Integração agricultura-pecuária**. Viçosa, UFV/DFP/DFT, p.11-44.

PERINA, F.J. Óleos essenciais e frações majoritárias ativas no controle da mancha marrom de alternaria (*Alternaria alternata*) em tangerina ponkan. 2014. 112f. **Tese** (Doutorado em Agronomia). Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2014.

PIZZINATTO, M.A. et al. Associação de *Alternaria macrospora* e *A. alternata* a sementes de algodoeiro e sua ação patogênica. **Summa Phytopathologica**, v.31, n.4, p.311-318, 2005.

QUEIROGA, M.F.C. et al. Aplicação de óleo o controle de *Zabrotes subfasciatus* e na germinação de *Phaseolus vulgaris*. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.16, n.7, p.777-783, 2012.

RICCIONI, L.; ORZALI, L. Activity of tea tree (*Melaleuca alternifolia*, Cheel) and thyme (*Thymus vulgaris*, Linnaeus.) essential oils against some pathogenic seed borne fungi. **Journal of Essential Oil Research**, v.23, n.6, p.43–47, 2011.

REIS, E.M.; CASA, T.R.; HOFFMANN, L.L. Controle cultural de doenças radiculares. In: MICHEREFF, S.J.; ANDRADE, D.E.G.T.; MENEZES, M. (Ed.). **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**. Recife: Universidade Federal e Rural de Pernambuco, p. 279-301, 2005.

RODRIGUES, A.A.C; MENEZES, M. Detecção de fungos endofíticos em sementes de caupi provenientes de Serra Talhada e de Caruaru, estado de Pernambuco. **Fitopatologia Brasileira**, v.27, n.5, p.532-537, 2002.

RODRIGUES, E. A. et al. Potencial da planta medicinal *Ocimum gratissimum* no controle de *Bipolaris sorokiniana* em sementes de trigo. **Acta Scientiae Agronomy**, Maringá, v.28, n.2, p. 213-220, 2006.

ROZWALKA, L.C. Extratos, decotos e óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas na inibição de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides* de frutos de goiaba. **Ciência Rural**, v.58, n.2, p.301-307, 2008.

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.

SAGAVE, L. **Atividade de diferentes formulações de Melaleuca alternifolia e terpinen-4-ol em isolados de *Rhodococcus equi* de diferentes origens**. SAMPAIO, S. A. P.; RIVITTI, E. A. Dermatologia. São Paulo, editora: Artes Médicas, 3 edição, 2014

SANTOS, L. A.C. et al. Crescimento de cultivares de feijão-caupi em solo de terra firme e várzea. **Ambiência Guarapuava**, v.13, n.1, p.261-270, 2017.

SANTOS, P.L. 2018. Manejo de *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. em sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) com óleos essenciais e antagonistas. 2018. 76fls. **Tese** (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP.

SILVA, M. A. D.; SILVA, W.R. Comportamento de fungos e de sementes de feijoeiro durante o teste de envelhecimento artificial. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, n.3, p.599-608, 2000.

SILVA, A.C. et al. Efeito *in vitro* de compostos de plantas sobre o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. isolado do maracujazeiro. **Ciência Agrotecnológica**, Lavras, v.33, Edição Especial, p. 1853-1860, 2009

SILVA, B.V. S. *et al.* Efeito dos óleos essenciais sobre o crescimento micelial *in vitro* de *Colletotrichum* spp. **Cadernos de Agroecologia**. v. 13, n. 2, p.1-9, 2018.

SILVA, J.L. et al. Atividade antifúngica de extratos vegetais sobre o crescimento *in vitro* de fitopatógenos. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Mossoró, v.7, n.1, p.80-86, 2012.

SILVA, M. et al. Qualidade fisiológica e armazenamento de sementes de feijão-comum produzidas no norte de Minas Gerais. **Revista Agro Ambiente**, v.8, p.97-103, 2014.

SILVA, P.H.S.; CARNEIRO, J.S.; QUINDERÉ, M.A.W. Pragas. In: FREIRE FILHO, F.R.; LIMA, J.A.A.; RIBEIRO, V.Q. (Eds). **Feijão-caupi: avanços tecnológicos**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, p.366-402, 2005.

SIMÕES C.M.O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª ed. Porto Alegre: UFRGS/UFSC, p.467-495. 2004.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2. ed. Porto Alegre: UFRGS, 467-492 p, 2007.

SIMÕES, C.M.O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; Gosmann, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: Da planta ao Medicamento**. 5. Ed. Porto Alegre: UFRGS, p. 467-495, 2004.

SIMÕES, R.P. et al. Efeitos do óleo de *Melaleuca alternifolia* sobre a infecção estafilocócica. **Lecta**, v. 20, n. 2, p. 147-152, 2002.

SINHA, A.; SINGH, S.K.; QAISAR, J. Seed mycoflora of French bean and its control by means of fungicides. **Tropenlandwirt. Witzenhausen**, v.11, n.1, p.59-67, 1999.

- 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. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.17, n.4, p.1078-1082, 2015.
- TÖFOLI, J.G.; DOMINGUES, R.J., FERRARI, J.T. *Alternaria* spp. em oleráceas: Sintomas, etiologia, manejo e fungicidas. **Biológico**, v.77, n.1, p.21-34, 2015.
- TORRES, S.B.; BRINGEL, J.M.M. Avaliação da qualidade sanitária e fisiológica de sementes de feijão macassar. **Caatinga**, v.18, n.2, p.88-92, 2005.
- VERMA, P.R.; SAHARAN, G.S. **Monograph on Alternaria diseases of crucifers**. Saskatoon: Minister of Supply and Services Canada, 162p, 1994.
- VIEIRA, T.R. et al. Constituintes químicos de *Melaleuca alternifolia* (Myrtaceae). **Química Nova**, v.27, n.4, p.536-539, 2004.
- WANDERLEY, M.J.A.; SILVA, T.M. B.; ARRUDA, J.D.; ROCHA, R.B.; CRUZ, C.S.A.; WANDERLE, P. A. Efeito de óleos essenciais sobre *Callosobruchus maculatus* em feijão caupi *Vigna unguiculata* L. Walp. **In: 6º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel**. 2009. Minas Gerais, Montes Claros, 2009.
- WOUDENBERG, J.H.C. et al. *Alternaria* redefined. **Studies in Mycology**, v.75, p.171-212, 2013.