**EFEITO DE EXTRATOS DE DUAS FORMAS DE *Lippia alba* SOBRE O
FUNGO *Colletotrichum gloeosporioides* (PENZ.), ISOLADO DE *Citrus* sp.**

MARILDA MARIA F. BORGES DOS SANTOS

Engenheiro Florestal

Orientador: Prof. Dr. SÉRGIO FLORENTINO PASCHOLATI

Dissertação apresentada à Escola Superior
de Agricultura "Luiz de Queiroz" da
Universidade de São Paulo, para obtenção
do título de Mestre em Ciências. Área de
Concentração: Fisiologia e Bioquímica de
Plantas

P I R A C I C A B A

Estado de São Paulo - Brasil

Abril - 1996

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Santos, Marilda F. Borges dos

Efeito de extratos de duas formas de *Lippia alba* sobre o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (PENZ.), isolado de *Citrus* sp. / Marilda Maria F. Borges dos Santos.
Piracicaba, 1996.
105p. : il.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1996.
Bibliografia.

1. Fungicida biológico 2. Melissa - Propriedade fitossanitária 3. Planta produtora de fungicida 4. Queda de frutos jovens de citros - Controle integrado I. Título

CDD 632.952

EFEITO DE EXTRATOS DE DUAS FORMAS DE *Lippia alba* SOBRE O FUNGO *Colletotrichum gloeosporioides* (PENZ.), ISOLADO DE *Citrus* sp.

MARILDA MARIA F. BORGES DOS SANTOS

Aprovada em 20.06.1996

Comissão julgadora:

Prof. Dr Sérgio Florentino Pascholati

ESALQ/USP

Prof. Dr. Luiz Antonio Gallo

ESALQ/USP

Prof. Dr. Breno Leite

UFP/Curitiba

Prof. Dr. Sérgio Florentino Pascholati

Orientador

*"Nascer, viver, morrer, renascer ainda e progredir sempre,
tal é a Lei"*

Allan Kardec

À minha mãe, Therezinha, pela presença
marcante em mais essa vitória
e à minha avó Luisa, cuja lembrança
já se faz saudade,

DEDICO

Ao Paulo,

com amor,

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

No desenvolvimento desse trabalho, houve pessoas que marcaram de uma forma decisiva, no apoio e no incentivo. Entre essas pessoas, o Prof. Dr. Quirino Augusto C. Carmello, o Prof. Dr. Murilo de Melo, o Prof. Dr. Antonio Augusto Lucchesi, o Prof. Dr. Luiz Eduardo Gutierrez e o Prof. Dr. Sérgio F. Pascholati, merecem o meu respeito e agradecimentos sinceros, pois sempre me acolheram com amizade e consideração, me orientando no melhor caminho a seguir. Em especial atenção, agradeço ao Prof. Dr. Sérgio F. Pascholati que, como orientador no desenvolvimento desse trabalho, mostrou-se não só um orientador, mas um amigo.

Agradeço as demais pessoas igualmente importantes nesse meu caminho. Elas são muitas, sendo que todas colaboraram de alguma forma, principalmente com a amizade. E esses amigos com certeza, sabem disso: Kátia, José Renato, Nelson, Robson, Fabiana, Hélio, Everaldo, Thaís, Márcia, Marise, Cecília, Raquel, Heloísa, Evelyn, Góes, Renata, Gisele Fantin e Gisele Torres.

Ao Prof. Dr. Lin C. Ming, do Departamento de Horticultura da Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP/Botucatu, ao Prof. Dr. Breno Leite, do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, ao Prof. Vinicius Castro Souza do Departamento de Botânica da ESALQ/USP, à Maria de Lourdes Perin Storer, do Laboratório de Nutrição Humana e Alimentos do Departamento de Economia Doméstica, ao Antônio Carlos Ferreira, do Laboratório de Análises do Departamento de Ciência do Solo, ao Pedro C. Arthuso, José Rodolfo Groppo e Fernanda Yeda Bassa

Grosso, do Departamento de Fitopatologia e à Clotilde Maria Batochio Cunha, da Revista *Scientia Agricola*, pela colaboração e apoio prestados durante todo o transcorrer do trabalho.

Aos amigos da Biblioteca, muitos que não conseguimos gravar os nomes, tamanho o número das consultas quase diárias a livros, revistas, normas e técnicas: o pessoal do empréstimo de livros/revista, do xerox, da limpeza e às bibliotecárias. Em especial, agradeço à Katia Maria de Andrade Ferraz, Eliana Maria Garcia Sabino, Silvana Cristina Nascimento Oliveira, Luzia de Fátima S. Possato e Roseli Terezinha de Barros, que no dia-a-dia, ofereciam muito mais do que suas possibilidades, sempre com alguma palavra de ânimo e alegria.

Aos amigos de sempre, companheiros diários das minhas alegrias, desânimos, recomeços e vitórias: Mônica, Ira, Ariane, Claudia, Tanaka, Simone e Cristina.

Ao Paulo, que praticamente passou tudo isso comigo, curtindo cada descoberta, me animando, me aguentando, me conquistando mais com seu carinho sem medidas, pois ele, mais do que ninguém, sabe o quanto tudo isso foi e é importante para mim.

À CAPES, que possibilitou que a minha dedicação fosse total e exclusiva, para o desenvolvimento desse trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	xiv
SUMMARY.....	xvi
 1. INTRODUÇÃO.....	 1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. Compostos secundários em plantas.....	4
2.1.1. Definição e importância.....	4
2.1.2. Ocorrência e distribuição.....	6
2.1.3. Principais grupos de compostos secundários.....	6
2.1.4. Compostos secundários x microrganismos.....	7
2.1.5. Óleos essenciais.....	9
2.2. Atividade antimicrobiana de substâncias vegetais.....	12
2.2.1. Óleos essenciais.....	13
2.2.2. Extratos vegetais.....	16
2.3. <i>Lippia alba</i>	18
2.3.1. Descrição botânica e ocorrência.....	18
2.3.2. Sinonímia popular.....	20
2.3.3. Óleos essenciais de <i>L. alba</i>	21
2.3.4. Uso de <i>L. alba</i> na medicina popular.....	24
2.3.5. Óleos essenciais de <i>L. alba</i> e fitopatógenos vegetais.....	26
2.4. <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	28
2.4.1. Descrição e importância.....	28
2.4.2. Queda de frutos jovens de citrus.....	30
2.4.2.1. Importância e ocorrência.....	30
2.4.2.2. Sintomas.....	32
2.4.2.3. Controle.....	33

2.4.3. Apressório.....	33
2.4.3.1. Importância.....	33
2.4.3.2. Formação.....	34
2.4.3.3. Relação apressório x hospedeiro.....	36
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	39
3.1. Obtenção do material vegetal.....	39
3.2. Germinação e formação de apressórios por conídios de <i>C. gloeosporioides</i> sobre membrana de poliestireno.....	40
3.3. Germinação e formação de apressórios por conídios de <i>C. gloeosporioides</i> em contato com discos de folhas secas de <i>L. alba</i>	41
3.3.1. Desinfecção do material vegetal.....	41
3.3.2. Discos de folhas de <i>L. alba</i> - F.1 e F.2 x <i>C. gloeosporioides</i>	42
3.3.3. Microscopia eletrônica de varredura.....	44
3.4. Germinação e formação de apressórios por conídios de <i>C. gloeosporioides</i> em contato com extratos de <i>L. alba</i> , sobre superfície de poliestireno.....	45
3.5. Germinação e formação de apressórios por conídios de <i>C. gloeosporioides</i> em diferentes superfícies de contato.....	46
3.6. Efeito dos extratos orgânicos e aquoso do tecido foliar de <i>L. alba</i> sobre o crescimento micelial de <i>C. gloeosporioides in vitro</i>	47
3.7. Bioensaio para frações fungitóxicas presentes nos extratos de folhas secas de <i>L. alba</i>	49
3.8. Determinação do conteúdo de proteínas e carboidratos totais.....	51
3.9. Determinação de micro e macronutrientes em discos foliares desinfectados e não desinfectados de <i>L. alba</i>	53
3.10. Análise estatística.....	53

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
4.1. Material vegetal, análises de solo e foliar.....	54
4.2. Germinação e formação de apressórios por conídios de <i>C. gloeosporioides</i> sobre membrana de poliestireno.....	57
4.3. Germinação e formação de apressórios por conídios de <i>C. gloeosporioides</i> em contato com discos de folhas secas de <i>L. alba</i>	58
4.4. Germinação e formação de apressórios por conídios de <i>C. gloeosporioides</i> em contato com extratos de <i>L. alba</i> , sobre superfície de poliestireno.....	60
4.5. Germinação e formação de apressórios por conídios de <i>C. gloeosporioides</i> em diferentes superfícies de contato.....	62
4.6. Efeito dos extratos orgânicos e aquoso fo tecido foliar de <i>L. alba</i> sobre o crescimento micelial de <i>C. gloeosporioides in vitro</i>	63
4.7. Bioensaio para frações fungitóxicas presentes nos extratos de folhas de <i>L. alba</i>	65
4.8. Determinação de micro e macronutrientes, carboidratos e proteínas em folhas de <i>L. alba</i>	65
4.9. Efeito fungitóxico nutricional.....	67
5. CONCLUSÃO.....	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70
APÊNDICE.....	85

APÊNDICE

- Tabela 1 - Resultados da análise de solo, a partir de amostras de solo à 0,0 - 0,20 m e 0,20 - 0,40 m de profundidade..... 86
- Tabela 2 - Bioensaio usando cromatografia de camada delgada para a detecção de frações fungitóxicas presentes nos extratos foliares de *Lippia alba* forma 1 ou forma 2..... 87
- Tabela 3 - Teores de macro e micronutrientes em folhas secas de *Lippia alba* desinfectadas ou não..... 88
- Tabela 4 - Conteúdo de proteínas e carboidratos totais em folhas secas de *Lippia alba* (F1) e (F2) e na água de lixiviação das folhas..... 89
- Figura 1 - Aspecto de *Lippia alba* - formas F1 (A) e F2 (B) - em condições de campo e, (C) - detalhe do ramo e folhas aos 3 meses..... 90
- Figura 2 - Germinação de conídios e formação de apressórios por *Colletotrichum gloeosporioides*, sobre superfície de poliestireno. T.G. - tubo germinativo; AP - apressório. As barras representam o desvio padrão da média. 91
- Figura 3 - Efeito de discos de folhas de *Lippia alba* - F.1 - na germinação de conídios e formação de apressórios por *C. gloeosporioides*, após diferentes tempos de contato dos discos com a suspensão de esporos. Tratamentos: 1- contato imediatamente após gotejamento da suspensão de esporos; 2- contato após 30 min do gotejamento da suspensão de esporos; 3- contato após 60 min do

gotejamento da suspensão de esporos; 4- contato após 120 min do gotejamento da suspensão de esporos; 5- testemunha (água destilada e esterilizada). As barras representam o desvio padrão da média. T.G. - tubo germinativo; AP - apressório..... 92

Figura 4 - Efeito de discos de folhas de *Lippia alba* - F.2 - na germinação de conídios e formação de apressórios por *C. gloeosporioides*, após diferentes tempos de contato dos discos com a suspensão de esporos. Tratamentos: 1- contato imediatamente após gotejamento da suspensão de esporos; 2- contato após 30 min do gotejamento da suspensão de esporos; 3- contato após 60 min do gotejamento da suspensão de esporos; 4- contato após 120 min do gotejamento da suspensão de esporos; 5- testemunha (água destilada e esterilizada). As barras representam o desvio padrão da média. T.G. - tubo germinativo; AP - apressório..... 93

Figura 5 - Efeito de discos de folhas de *Lippia alba* - F1 e F2 - no comprimento (A) e na largura (B) de tubos germinativos de conídios de *C. gloeosporioides*, após diferentes tempos de contato com a suspensão de esporos. Tratamentos: 1. F1 - contato dos discos de folhas da forma 1 com a suspensão de esporos, imediatamente após o gotejamento; 1. F2 - contato dos discos de folhas da forma 2 com a suspensão de esporos, imediatamente após o gotejamento; 4. F1 - contato dos discos de folhas da forma 1, após 120 min do gotejamento; 4. F2 - contato dos discos de folhas da forma 2, após 120 min do gotejamento. T - testemunha (suspensão de esporos sem disco foliar). As barras representam o desvio padrão da média..... 94

Figura 6 - Influência de discos de folhas de *Lippia alba* - F1 e F2 - na germinação e formação de apressórios por conídios de *C. gloeosporioides*, sobre

superfície de poliestireno. A - testemunha (suspensão de esporos sem disco foliar); B - discos de folhas de F1 colocados em contato com os conídios 120 min após o gotejamento; C - discos de folhas de F2 colocados em contato com os conídios 120 min após o gotejamento; c - conídio; tg - tubo germinativo; ap - apressório. Aumento de 400 x; barras = 10,7 μm .

..... 95

Figura 7 - Microscopia eletrônica de varredura ilustrando a influência de discos de folhas de *Lippia alba* - F1 e F2 - na germinação e formação de apressórios por conídios de *C. gloeosporioides*, sobre superfície de poliestireno. A - testemunha (suspensão de esporos sem disco foliar). Barra = 4 μm ; B - discos de folhas de *Lippia alba* - F1 - na germinação e formação de apressórios por conídios de *C. gloeosporioides*, sobre superfície de poliestireno. Barra = 10 μm . C - discos de folhas de *Lippia alba* - F2 - na germinação e formação de apressórios por conídios de *C. gloeosporioides*, sobre superfície de poliestireno. Barra = 10 μm . c - conídio; tg - tubo germinativo; ap - apressório..... 96

Figura 8 - Efeito de extratos de *Lippia alba* (F1) obtidos com acetona, etanol ou hexana na germinação de conídios de *Colletotrichum gloeosporioides*, sobre superfície de poliestireno. Tratamentos: diluições (extrato : água ou solvente : água; v/v) - 1 (1:9); 2 (1:99); 3 (1:999) -. E - extrato; S - solvente puro; T - água destilada esterilizada. Avaliações efetuadas 19 horas após o início dos experimentos. Barras representam o desvio padrão da média..... 97

Figura 9 - Efeito dos extratos de *Lippia alba* (F2) obtidos com acetona, etanol ou hexana na germinação de conídios de *Colletotrichum gloeosporioides*, sobre superfície de poliestireno. Tratamentos: diluições (extrato : água ou solvente

: água; v/v) - 1 (1:9); 2 (1:99); 3 (1:999) -. E - extrato; S - solvente puro; T - água destilada esterilizada. Avaliações efetuadas 19 horas após o início dos experimentos. Barras representam o desvio padrão da média..... 98

Figura 10 - Efeito de extratos de *Lippia alba* (F1) obtidos com acetona, etanol ou hexana na formação de apressórios por *Colletotrichum gloeosporioides*, sobre superfície de poliestireno. Tratamentos: diluições (extrato : água ou solvente : água; v/v) - 1 (1:9); 2 (1:99); 3 (1:999) -. E - extrato; S - solvente puro; T - água destilada esterilizada. Avaliações efetuadas 19 horas após o início dos experimentos. Barras representam o desvio padrão da média..... 99

Figura 11 - Efeito de extratos de *Lippia alba* (F2) obtidos com acetona, etanol ou hexana na formação de apressórios por *Colletotrichum gloeosporioides*, sobre superfície de poliestireno. Tratamentos: diluições (extrato : água ou solvente : água; v/v) - 1 (1:9); 2 (1:99); 3 (1:999) -. E - extrato; S - solvente puro; T - água destilada esterilizada. Avaliações efetuadas 19 horas após o início dos experimentos. Barras representam o desvio padrão da média..... 100

Figura 12 - Germinação de conídios e formação de apressórios por *Colletotrichum gloeosporioides* em diferentes superfícies. Tratamentos: 1 - BDA (batata-dextrose-água); 2 - AA (água-água); 3 - poliestireno (suspensão de esporos + glicose); 4 - poliestireno (testemunha; suspensão de esporos sem glicose). Avaliação efetuada após 19 h. T.G. - tubo germinativo; AP - apressório. As barras representam o desvio padrão da média..... 101

- Figura 13 - Efeitos de diferentes meios ou superfícies no comprimento e largura do tubo germinativo de *Colletotrichum gloeosporioides*, após 15 h de incubação. Tratamentos: 1 - BDA (batata-dextrose-ágar); 2 - AA (ágar-água); 4 - poliestireno (testemunha; suspensão de esporos sem glicose). As barras representam o desvio padrão da média..... 102
- Figura 14 - Efeito de extratos orgânicos obtidos, a partir de folhas secas de *Lippia alba* - forma 1 (A) e forma 2 (B), sobre o crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*, em meio de BDA (batata-dextrose-ágar). Tratamentos: EA -extrato acetônico; CA - controle acetônico; EE - extrato etanólico; CE - controle etanólico; EH - extrato hexânico; CH - controle hexânico; T - testemunha (água destilada esterilizada). Avaliação efetuada após 5 dias de crescimento..... 103
- Figura 15 - Efeito de extratos orgânicos (acetona, etanol e hexana) obtidos a partir de tecidos foliar de *Lippia alba* - forma 1 (A) e forma 2 (B), sobre o crescimento de *Colletotrichum gloeosporioides*, após 5 dias. (C) - solvente sozinho (puro). Testemunha - solventes substituídos por água destilada esterilizada..... 104
- Figura 16 - Efeito dos extratos aquosos, obtidos a partir de folhas secas de *Lippia alba*, forma 1 e forma 2, sobre o crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* em meio BDA (batata-dextrose-ágar). Tratamentos: EA1 - extrato aquoso da forma 1; EA2 - extrato aquoso da forma 2; T - testemunha (ausência de extrato). Avaliação efetuada após 5 dias de crescimento. As barras representam o desvio padrão da média..... 105

EFEITO DE EXTRATOS DE DUAS FORMAS DE *Lippia alba* SOBRE O FUNGO *Colletotrichum gloeosporioides* (PENZ.), ISOLADO DE *Citrus* sp.

Autor: MARILDA MARIA F. BORGES DOS SANTOS

Orientador: Sérgio Florentino Pascholati

RESUMO

Lippia alba (Mill.) N.E. Br. ex Britt & Wilson - Verbenaceae - é relatada como uma planta medicinal com efeito fungitóxico para vários fungos fitopatogênicos. Dessa maneira, procurou-se estudar o efeito dos componentes metabólicos de *L. alba* sobre o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.), causador da doença "queda de frutos jovens de citros", que tem causado grandes prejuízos em culturas de citros.

Testes realizados a partir de discos foliares de duas formas de *L. alba* - forma 1 (F1) e forma 2 (F2) - mantidos em contato com gotas de suspensões de conídios de *C. gloeosporioides*, sobre superfície de poliestireno durante diferentes períodos de tempo, demonstraram que substância(s) presente(s) em folhas secas das duas formas de *L. alba* altera(m) o padrão de germinação dos conídios, aumentando o comprimento e a largura do tubo germinativo e impedindo a formação do apressório. A não formação de apressórios pelos conídios foi também demonstrada a partir do contato de extratos

acetônicos, etanólicos e hexânicos com gotas de suspensão de esporos em lâminas de poliestireno. Utilizando-se esses extratos, sobre meio BDA em placas de Petri, verificou-se também o efeito dos mesmos sobre o crescimento micelial de *C. gloeosporioides*. O extrato etanólico mostrou-se como o mais eficiente na redução do crescimento micelial, enquanto que o extrato aquoso não exibiu efeito algum nesse sentido.

Através de bioensaios para frações fungitóxicas, pelo uso de placas para cromatografia delgada, demonstrou-se também o efeito fungitóxico dos extratos provenientes das duas formas de *L. alba*, com o aparecimento de diferentes zonas de inibição do crescimento de *C. gloeosporioides*, comprovando-se o efeito fungitóxico de todos os extratos, inclusive o aquoso, para as duas formas de *L. alba*.

A quantificação de proteínas e carboidratos totais, bem como análise de macro e micronutrientes realizadas nas folhas secas das duas formas de *L. alba* não forneceram evidências para se efetuar correlações sobre o papel desses compostos na atividade fungistática apresentada.

**EFFECT OF EXTRACTS OBTAINED FROM TWO DIFFERENT
FORMS OF *Lippia alba* ON DEVELOPMENT OF THE FUNGUS**

***Colletotrichum gloeosporioides*, ISOLATED FROM *Citrus* sp.**

Author: MARILDA MARIA F. BORGES DOS SANTOS

Adviser: Sérgio Florentino Pascholati

SUMMARY

Lippia alba (Mill.) N.E.Br. ex Britt & Wilson - Verbenaceae - is reported as a medicinal plant exhibiting fungitoxic effects on different plant pathogenic fungi. Thus, the present work was carried out to study the effect of *L. alba* extracts on *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.), the causal agent of "postbloom fruit drop of citrus", a disease that is causing serious losses in citrus production.

Leaf discs from two different forms of *L. alba* - form 1 (F1) and form 2 (F2) - kept in contact with conidium suspensions of *C. gloeosporioides* on polystyrene surface, during different times, showed that substances present in dry leaves of both forms of *L. alba* alter the germination pattern of conidia by increasing the length and width of germ tube and inhibiting appressorium formation. Organic extracts (in acetone, ethanol and hexane) obtained from leaf tissue when in contact with spore suspensions

also exhibited inhibitory activity on appresorium formation over polystyrene surface. By using these organic extracts on PDA (potato-dextrose-agar) medium inside Petri dishes it was also possible to demonstrate the effect of them on the mycelial growth of the fungus. The ethanol extract exhibited the highest effect on growth reduction, while the aqueous extract (control) did not have any effect on the vegetative growth.

Biossays with plates for thin-layer chromatography also demonstrated the fungitoxic effects of *L. alba* extracts based upon the appearance of inhibition zones of *C. gloeosporioides* growth.

Determination of total protein and carbohydrate contents as well as macro and micronutrients analysis of the leaf tissues did not furnish any evidence for further correlations on the role of these compounds on the toxic activity of the extracts.

INTRODUÇÃO

Plantas superiores muitas vezes são vistas como fontes úteis de substâncias fungitóxicas, as quais, quando comparadas com fungicidas sintéticos, mostram-se praticamente inofensivas para o ambiente, podendo até superá-los em sua ação fungitóxica (Fawcett & Spencer, 1970).

Aspectos inerentes a muitas dessas substâncias, como ausência de fitotoxicidade, amplo espectro fungitóxico, sistemicidade e natureza biodegradável (Fawcett & Spencer, 1970), aliados ao crescimento exuberante de muitas dessas plantas e do caráter atóxico para homens e animais, fazem com que essas plantas proporcionem múltiplos usos.

Lippia alba (Mill.) N. E. Br. ex BRITT & WILSON, conhecida popularmente como falsa melissa, entre outros inúmeros nomes populares, é uma dessas plantas. Possuindo ampla distribuição em toda a América do Sul, é utilizada pela população, principalmente na forma de chá das folhas, por sua ação calmante, estomáquica, carminativa, entre outras, atribuída à presença de óleo essencial nesses tecidos (Albuquerque, 1989).

Em relação ao aspecto fungitóxico, extratos contendo o óleo essencial de *L. alba* mostraram-se efetivos contra *Rhizoctonia solani*, *Absidia ramosa*, *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *Chaetomium globosum*, *Cladosporium cladosporioides*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. dematium*, *Curvularia lunata*, *Penicillium italicum* e *Rhizopus arrhizus* (Kishore et al., 1983).

C. gloeosporioides (Penz) é o agente causal da doença "queda de frutos jovens de citros", que vem afetando quase todas as variedades de citros, principalmente aquelas que apresentam vários surtos de floração ou que o fazem na época das chuvas (Feichtenberger, 1991; Prates, 1991). Grandes prejuízos têm sido atribuídos a essa doença, que atualmente está incluída entre as principais doenças fúngicas, em citros, no Estado de São Paulo.

As medidas de controle baseiam-se em aplicações de produtos à base de Benomil, antes e depois da abertura das flores, em pomares suscetíveis, onde condições de grande umidade coincidem com o florescimento, ou naquelas variedades que exibem vários períodos de florescimento (Feichtenberger, 1991). Chlorothalonil e Thiabendazol também são recomendados, mas com certa restrição por serem menos eficientes (Feichtenberger, 1991; Prates, 1991; Whiteside et al., 1989).

O uso abusivo e indiscriminado de agentes químicos vem despertando o meio científico para os riscos que esse tipo de controle pode acarretar ao ambiente (Lopez, 1991). Nesse interim, o controle biológico vem ocupando cada vez mais espaço junto às demais formas de controle, pois, de acordo como Cook & Baker (1989) e Baker (1987), a finalidade do controle biológico é a redução do inóculo e das atividades determinantes da doença provocada por um patógeno, realizada por um ou mais organismos que não o homem.

Com base no exposto, este trabalho teve por objetivo estudar o efeito, *in vitro*, de tecidos e extratos obtidos com solventes de diferentes polaridades (etanol, acetona, hexana e água), a partir das folhas de duas formas de *L. alba* - Forma 1 (F1) e Forma 2 (F2) - sobre o fungo *C. gloeosporioides* (Penz).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Compostos secundários em plantas

2.1.1. Definição e importância

Segundo Giesbrecht (1980), nas plantas existem diversas vias metabólicas secundárias que levam à formação de compostos, cuja distribuição é restrita a algumas famílias, gêneros ou até mesmo espécies. Esses metabólitos secundários, até bem pouco tempo atrás possuíam, na sua maioria, função desconhecida nos vegetais. Hoje, já se sabe que o conteúdo dos compostos secundários nas plantas, é resultado do balanço entre sua formação e eliminação durante o seu crescimento. Isso decorre, principalmente de dois grupos de fatores: fatores genéticos (hereditários) e portanto fixos e, fatores ambientais como a luz, a temperatura, o solo, a água, etc (Correa Jr. et al., 1994).

Com o advento da Ecologia Bioquímica sabe-se que esses compostos possuem importantes funções nos vegetais, pois se constituem em substâncias que

agem na preservação da integridade das plantas contra ataques de seus predadores quer sejam essas bactérias, fungos, insetos ou herbívoros, na atração de polinizadores e dispersores de sementes e podendo também conferir resistência (alelopatia) (Correa Jr. et al., 1994). Dessa maneira, os compostos secundários podem estar envolvidos e/ou exibir funções de reserva, proteção contra radiação UV, proteção contra estresse osmótico e nutricional, atração e polinização de organismos, alelopatia, interações com outras plantas, etc (Bennett & Wallsgrove, 1994). Além disso, os compostos secundários na planta, não estão diretamente envolvidos com o seu crescimento, mas estão relacionados com suas respostas fisiológicas e bioquímicas ao ambiente (Miachir, 1992).

O papel dos compostos secundários vegetais nos processos de defesa das plantas, contra formas de predação, infecção ou parasitismo, pode envolver atividades de impedimento alimentar (anti-herbivoria), toxicidade ou como precursor para sistemas de defesa físicos (Bennett & Wallsgrove, 1994). Esses compostos, quando incorporados ao organismo animal, produzem variados efeitos, do qual decorre a classificação das plantas em medicinais quando esse efeito é benéfico e, plantas tóxicas quando esse efeito é tóxico ou causa algum dano. Como efeito benéfico que os compostos secundários podem causar nos animais, têm-se: analgésico, hipotensor, diurético, antiséptico, descongestionante, cicatrizante, etc.

2.1.2. Ocorrência e Distribuição

Embora os compostos secundários possuam distribuição limitada no reino vegetal (Balandrin & Klocke, 1988), a distribuição de um composto secundário no interior da planta, nos tecidos e durante o crescimento, é raramente uniforme. Muitos compostos são produzidos e armazenados em tecidos jovens, particularmente folhas, ou então, em tecidos reprodutivos como flores e sementes (Bennett & Wallsgrove, 1994).

Segundo Balandrin & Klocke (1988), visto que a produção e o acúmulo de compostos secundários pelas plantas é metabolicamente dispendiosa, os mesmos são encontrados em quantidades mínimas, quando comparados com os compostos primários. O que também pode ser explicado pela pressão evolutiva sofrida por esses compostos, juntamente com as plantas, exibindo uma atividade biológica potente mesmo em concentrações mínimas.

2.1.3. Principais grupos de compostos secundários

A natureza desses compostos varia de espécie para espécie, sendo geralmente constante dentro da mesma espécie vegetal, podendo por isso, serem usados como marcadores taxonômicos (Bennett & Wallsgrove, 1994).

A partir dos carboidratos, percorrendo diferentes rotas metabólicas, as plantas produzem os compostos secundários, os quais podem ser separados, de acordo com as estruturas químicas, em alguns grupos: alcalóides, óleos essenciais (terpenóides), taninos, glicídeos, ácidos orgânicos, ácidos urônicos e heterosídeos (Correa Jr. et al., 1994).

Uma enorme variedade de compostos são derivados do ácido shiquímico ou de aminoácidos aromáticos (Bennett & Wallsgrove, 1994). Enquanto que, glicosídeos cianogênicos, glucosinolatos, aminoácidos não proteicos, alcalóides, fenóis (terpenóides, fenilpropanóides, ácido cinâmico, precursores de lignina, ácidos hidroxibenzóicos, taninos, isofavonóides, etc), fitoalexinas, ácido salicílico e metil jasmonato, são compostos secundários relacionados aos mecanismos de defesa das plantas (Bennett & Wallsgrove, 1994; Pascholati & Leite, 1994; Pascholati & Leite, 1995).

2.1.4. Compostos secundários x microrganismos

O estudo sistemático de plantas superiores na tentativa de se detectar e isolar substâncias antimicrobianas a partir de seus tecidos, deve ter sido inspirado grandemente pelo desejo de se encontrar novas substâncias tóxicas para os microrganismos patogênicos, tendo o seu início após o hábito de se usar plantas e

extratos dessas, para a cura de doenças humanas (Skinner, 1955). Deve-se ressaltar que, em geral, as substâncias antimicrobianas em plantas são detectadas pela observação de respostas de crescimento de vários microrganismos em contato com os tecidos ou extratos vegetais.

Parece claro que alguns sistemas de compostos secundários são dinâmicos, respondendo à ataques, infecções e estresses e que o aumento da síntese/acúmulo de tais compostos é parte de um mecanismo de defesa integrado (Bennett & Wallsgrove, 1994; Pascholati & Leite, 1994; Pascholati & Leite, 1995). Geralmente não é somente um único metabólito ou classe dele que, presente em uma planta, conferirá a ela resistência. Mas, sim, uma variedade de compostos; além de mecanismos de defesa química, existem mecanismos de resistência física como pelos glandulares, ceras cuticulares, espinhos e outros (Bennett & Wallsgrove, 1994; Pascholati & Leite, 1994; Pascholati & Leite, 1995).

Substâncias antimicrobianas são encontradas em extratos aquosos de um grande número de plantas. Entretanto, nem todos os antibióticos de tecidos vegetais são solúveis ou extraídos diretamente com água. Skinner (1955) relata que diferentes solventes devem ser testados para um eficiente "screening" de plantas. Skinner (1955), citando Osborn¹ (1943), relata que extratos podem ser preparados a partir de material fresco ou seco, dando-se preferência ao material fresco, visto

¹ OSBORN, E. M. (1943). *Brit. J. Expl. Path.* v. 24, p.277.

que muitos antibióticos desaparecem nos tecidos das plantas secas. Entretanto, citando Winter & Willecke² (1952), esse autor ressalta que, ainda que a "capacidade" antimicrobiana de alguns extratos obtidos a partir de folhas secas decline, muitos não o fazem.

2.1.5. Óleos essenciais

Óleos essenciais, voláteis ou etéreos são compostos encontrados em várias plantas e que possuem como características básicas o cheiro e o sabor, além de serem insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos (Cecy, 1989), sendo extraídos por arraste de vapor (Costa, 1986). Embora insolúveis em água, podem transferir seu odor à mesma. Ocorrem nas plantas em estruturas especiais de secreção - estruturas celulares (organelas ou células especializadas), cavidades e canais esquizógenos ou lisígenos e pêlos glandulares, podendo ainda estar presentes no lenho das árvores (Gottlieb & Salatino, 1987).

Os óleos essenciais são importantes como matéria prima para a fabricação de medicamentos, perfumarias e especiarias (Cecy, 1989; Costa, 1986), visto possuírem características próprias como alto índice de refração e atividade óptica. Na maioria dos casos, possuem um índice de rotação específico, o que de acordo com Costa (1986), permite a distinção entre o produto natural e o sintético.

² WINTER, A.G. & WILLECKW, L. (1952). *Naturwiss*, **39**, 45; *Naturwiss* **39**, 190.

Mishra & Dubey (1990) relatam que nenhuma toxidez residual ocorreu no tratamento de produtos alimentícios (grãos) com óleo essencial de *Amomum sublatum*. Shethna & Rao (1981) relatam que alguns óleos podem se comportar como substâncias voláteis, não deixando na folha qualquer resíduo.

De acordo com Ming (1992), a classificação dos óleos essenciais é dificultada visto serem formados por uma mistura de diversos constituintes químicos - hidrocarbonetos, álcoois e ésteres, lactonas ou óxidos naturais, aldeídos e cetonas, fenóis e ésteres fenólicos - embora sejam geralmente constituídos por terpenóides (mono e sesquiterpenos) e lignóides (alil e propenilfenóis, cumarinas) (Gottlieb & Salatino, 1987).

O papel dos óleos essenciais encontrados nas plantas, está relacionado com a sua volatilidade, pois devido a essa característica, agem como sinais de comunicação química com o reino vegetal e como arma de defesa contra o reino animal. Assim, a planta libera ou exsuda, um conjunto de produtos que num ponto receptor, traduzirá esse sinal como benéfico ou prejudicial, desencadeando processos bioquímicos em resposta (Gottlieb & Salatino, 1987). Isso pode ser verificado, em casos de injúrias, infecções, danos por agentes diversos, onde o óleo essencial liberado irá intensificar no próprio vegetal a síntese de substâncias defensivas - fenóis e/ou taninos - ou mesmo, poderá penetrar no agente causador do dano (insetos, fungos, bactérias), alterando o equilíbrio hormonal, químico, etc (Gottlieb & Salatino, 1987).

No caso das interações planta-planta pode existir a alelopatia, onde uma certa planta exala ou libera substâncias voláteis para o solo, promovendo a inibição da germinação de sementes de qualquer outra planta que não as suas (Gottlieb & Salatino, 1987). Por exemplo, *Eucalyptus citriodora*, através da liberação de *p*-mentano 3,8-diois, inibe a germinação de sementes e o desenvolvimento de outras plantas que não a própria espécie (Nishimura et al., 1984).

A inoculação de *Ulmus glabra* (olmo) com o fungo *Ceratocystis ulmi*, induziu à formação de sesquiterpenos antifúngicos do tipo cadinano (Burden & Kemp, 1984).

De acordo com Skinner (1955), a presença de substâncias antimicrobianas vegetais pode ser verificada através de testes utilizando a planta inteira ou partes da planta que, em contato com os meios de cultura já semeados com o microrganismo desejado, exsudará para o mesmo a(s) substância(s) antibimicrobiana(s) causando a inibição do crescimento do microrganismo (zona de inibição). Além disso, extratos brutos (obtidos por pressão de tecidos vegetais) e extratos parcialmente purificados (aquosos, ou preparados com solventes a partir de ácidos fortes, ácidos fracos, álcoois fracos e éter), podem também ser usados.

A interação planta-animal está relacionada com a relação antiherbívora que os óleos essenciais desempenham, ou mesmo em ações repelentes ou que

impedem o desenvolvimento completo de um inseto (Gottlieb & Salatino, 1987). De acordo com Howe & Westley (1988), a função antiherbívora dos óleos essenciais compreende mais de 100.000 grupos químicos já identificados nos vegetais.

Em óleo de manjerição (*Ocimum basilicum*) verificou-se a presença de juvociminos, que possuem ação juvenilizante em larvas de insetos, sendo capaz de impedir o desenvolvimento morfológico dos insetos (Bowers & Nishida, 1980). Segundo Nishimura et al. (1984), terpenos voláteis produzidos por abetos (*Pseudotsuga membiesii*) quando depredados por cervos (*Odocoileus hemionus*), inibem a atividade bacteriana no rúmen do animal, levando a uma redução do consumo alimentar.

2.2. Atividade antimicrobiana de substâncias vegetais

As angiospermas constituem uma reserva quimioterápica e oferecem uma fonte inesgotável de várias substâncias, que podem ser exploradas em função de diferentes propriedades biológicas que exibem (Sbragia, 1975). Diversas pesquisas mostram que os constituintes de plantas superiores apresentam potencialidades em aspectos relativos à sua não fitotoxicidade, maior poder sistêmico e por serem pesticidas biodegradáveis (Fawcett & Spencer, 1970).

2.2.1. Óleos essenciais

Kishore et al. (1983) trabalhando com óleos essenciais de 22 plantas, através do método de placa invertida, verificaram que 9 plantas - *Annona squamosa*, *Cannabis sativa*, *Citrus aurantifolia*, *Erigeron bonariensis*, *Eupatorium sp*, *Euphorbia geniculata*, *Heliotropium indicum*, *Lantana indica*, *Murraya koenighii*, *Ocimum sanctum*, *Parthenium sp*, *Sonchus oleraceus*, *Solanum nigrum*, *Tagetes erecta* e *Tectona grandis* - exibiam elevado efeito fungitóxico (82 - 95 %), no tocante à inibição do crescimento micelial de *Rhizoctonia solani*. Enquanto que, extratos de folhas de *Antigonon leptopus*, *Blumea membranacea*, *Hyptis suaveolens* e *Ipomoea fistulosa* causaram 70 - 74 % de inibição.

Thompson (1986) demonstrou que óleos essenciais de louro, de casca de canela, de folha de canela, de cravo, de grãos de pimenta, de folha de pimenta e de tomilho, exibiam alta atividade protetora contra 10 espécies de *Rhizopus*, 4 espécies de *Mucor* e 8 isolados (2 espécies) de *Aspergillus*, entre 40 óleos essenciais testados. Esses resultados evidenciaram que os óleos essenciais dessas plantas podem ser vistos como um possível fator de proteção para alguns alimentos, na qualidade de aditivos antifúngicos.

Estudando o efeito dos óleos essenciais de algumas plantas sobre o crescimento micelial de *Rhizoctonia solani*, Dubey & Kishore (1987) verificaram que

as folhas de *Chenopodium ambrosioides*, *Lippia alba* e *Ocimum canum* mostravam-se bastante tóxicas. Os óleos dessas plantas foram estudados individualmente e em três combinações, sendo cada combinação efetuada com 2 óleos essenciais distintos (1:1; v/v), combinados 2 a 2. As três combinações mostraram-se mais fungitóxicas quando comparadas com cada óleo individualmente. As combinações do óleo essencial de *L. alba* com o óleo essencial das outras duas plantas (*L. alba* - *C. ambrosioides* e *L. alba* - *O. canum*) apresentaram um amplo espectro de fungitoxidade, sendo que a combinação *C. ambrosioides* - *O. canum*, exibiu um menor espectro. Após testes de fitotoxicidade com as três combinações de óleos, nenhum efeito foi verificado na germinação das sementes, crescimento e na morfologia geral de plântulas de *Phaseolus aureus*.

Lemos et al. (1990), avaliando os óleos essenciais de dez plantas brasileiras quanto às suas atividades antimicrobianas, verificaram que o óleo essencial de *Lippia sidoides* exibiu maior atividade contra todos os microrganismos testados - *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus flavus*, *Cryptococcus neoformans* e *Trychophyton mentagrophytes*.

Mishra & Dubey (1990), avaliando a fungitoxidade de 9 plantas angiospérmicas, através de seus óleos essenciais, contra *Aspergillus flavus*, um fungo de armazenamento de muitos gêneros alimentícios e responsável pela produção de aflatoxinas, encontraram resultados bastante promissores: *Aegle marmelos* (L.) Correa, ocasionou uma inibição de 85% do crescimento fúngico; *Ageratum*

houstonianum Mill, 85%; *Alpinia galanga* (L.) Willd, 85%; *Amomum sublatum* Roxb, 100%; *Artemisia vulgaris* Roxb, 66,%; *Curcuma longa* L., 70%; *Elettaria cardamomum* (L.) Maton, 60%; *Lippia alba* 85%; *Salvia plebeia* R. Br, 54%. Verificaram que a concentração inibitória mínima (CIM) do óleo de *A. sublatum* para a completa inibição de *A. flavus* foi de 3000 ppm. O óleo mostrou-se mais eficiente do que os fungicidas sintéticos Agrosan, GN, Ceresan, oxiclureto de cobre, Dithane M-45 e Thiovit, e não apresentou nenhum efeito adverso na germinação de sementes de arroz (*Oriza sativa*).

Taxol e outros compostos relacionados, obtidos a partir de *Taxus brevifolia*, foram testados com sucesso contra fungos fitopatogênicos, reduzindo o crescimento especialmente de espécies de *Phytophthora* e de *Pythium*, além de *Rhizoctonia solani* (Wagner & Flores, 1994).

Valarini et al. (1995) observaram que o óleo essencial obtido das folhas de *Cymbopogon citratus* (capim limão) a 10%, inibia totalmente o crescimento micelial de *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *R. solani*. O óleo também inibia totalmente a germinação de sementes de *Digitaria horizontalis* (capim colchão), *Sorghum hapelense* (capim massambará), *Bidens pilosa* (picão preto), *Euphorbia heterophylla* (leiteiro) e *Raphanus raphanistrum* (nabiça).

Estudando o efeito do bálsamo (óleo essencial) de copaíba - *Copaifera reticulata* sobre o crescimento de *Fusarium moniliforme*, em meio sólido e líquido, nas concentrações de 0,5%, 1,0% e 5,0%, em sementes e plântulas de milho, Diniz

et al. (1995) verificaram que, nas concentrações 0,5% e 1,0% houve menor desenvolvimento no número de colônias e na sua intensidade de pigmentação e na concentração de 5% a "despigmentação" das colônias foi muito acentuada, quando comparadas com o controle. Por sua vez, avaliando a germinação de conídios na presença do bálsamo nas concentrações de 5%, 10%, 20%, 40%, 80% e 100% em água, verificaram que nas concentrações menores a germinação dos conídios foi idêntica ao controle, enquanto que nas demais concentrações houve uma redução acentuada na germinação dos esporos.

2.2.2. Extratos vegetais

Na Índia, Alice & Rao (1987), trabalhando com extratos aquosos, filtrados e autoclavados de 31 espécies de plantas pertencentes a 22 famílias, verificaram que o máximo de inibição do crescimento de *Drechslera oryzae* foi obtido a partir de extratos de folhas de *Mentha piperita*, seguido por extrato de sementes de *Piper nigrum* e extrato de *Allium sativum*.

A partir de extratos de folhas de caroá (*Neoglaziovia variegata*) e sisal (*Agave sisalana*), Oliveira & Menezes (1995) evidenciaram a redução do crescimento micelial e da produção de esporos de *Fusarium oxysporum* f. sp *phaseoli*.

Laranjeira et al. (1995a), avaliando a ação de extratos concentrados da raspa do caule do juazeiro (*Zizyphus joazeiro*), em várias diluições em água,

sobre o crescimento de *Pseudomonas solanacearum*, verificaram a incapacidade dos mesmos nesse controle. Os mesmos autores (1995b), em outro experimento com extratos obtidos da mesma planta e de folhas de sisal (*Agave sisalana*), adicionados ao meio de BDA, observaram alterações no crescimento micelial, produção e fertilidade de picnídios do fungo *Botryodiplodia teobromae*.

Testando-se *in vitro* o efeito de extratos aquosos de *Lonchocarpus* sp e *Pilocarpus* sp sobre o fungo *Sclerotium rolfsii*, um importante patógeno do solo, concluiu-se que não havia influência das diferentes concentrações e espécies vegetais sobre a germinação e o crescimento de *S. rolfsii* (Rodrigues et al., 1995). Porém, para a produção de escleródios, os fatores concentração do extrato e espécie foram significativos, observando-se uma menor produção de escleródios a partir de 5×10^4 ppm. Com extrato aquoso da espécie *Pilocarpus* sp, a produção foi de 58,3 escleródios/placa, enquanto que para *Lonchocarpus* sp foi de 116 escleródios/placa.

A partir de uma formulação aquosa de extratos concentrados de folhas de *Reynoutria sachalinensis*, aplicada semanalmente numa concentração de 2%, Daayf et al. (1995) verificaram que essa formulação promovia o controle do míldio - *Sphaerotheca fuliginea* - em pepino e mostrava-se tão efetiva quanto o benomyl. A produção de frutos não foi afetada pelo tratamento. Notou-se também um rápido acúmulo de compostos fenólicos fungitóxicos nas folhas tratadas com essa formulação, indicando que essa formulação pode agir indiretamente na indução de reações de defesa na planta.

2.3. *Lippia alba*

2.3.1. Descrição botânica e ocorrência

L. alba (Mill) N.E. Br. ex BRITT & WILSON é um subarbusto decumbente, com ramos quadrangulares quando jovens. Planta aromática que atinge até 1,70m de altura. As folhas são simples, inteiras, membranáceas, pecioladas, pubescentes, com aroma cítrico e geralmente ocorrendo em número de 3 por nó. Apresentam limbo variável, com ápice agudo, base cuneada e decurrente, borda serreada (exceto na base), atingindo em média 8,3 cm de comprimento por 3,3 cm de largura. A inflorescência é axilar pedunculada, do tipo ramosa, com flores rosas, de fauce amarela, que ocorre em capítulos subglobosos. Floresce o ano todo. Não foram observados frutos (Correa, 1992). Originária da América do Sul (Brasil), vegeta em solos arenosos e úmidos - margens e rios, lagos e lagoas - preferindo regiões de climas tropical, subtropical até temperado (Correa et al., 1994).

Correa (1992) em estudo anatômico, histoquímico e do extrato aquoso de *Lippia alba*, concluiu que essa espécie está sujeita a grandes variações morfológicas, anatômicas e fitoquímicas, resultantes de adaptações às condições ambientais encontradas no local de procedência. Porém, do ponto de vista químico, os constituintes do óleo essencial são os mesmos, não havendo alteração entre eles.

Um outro aspecto que também poderia influenciar na plasticidade fenotípica da espécie é sua ampla distribuição no globo (Correa, 1992; Moldenke, 1961). Além disso, Moldenke (1961) cita que a espécie *L. alba* é extremamente variável e polimórfica, e segundo Vesque (1885), a subfamília a que pertence essa espécie - Verbenoideae, apresenta certa instabilidade na estrutura de órgãos habitualmente constantes.

De acordo com Andrade (s/d), a hierarquia da espécie *L. alba* é a seguinte:

Divisão - Spermatophytæ (Magnoliophytæ)

Sub-divisão - Angiospermae (Magnoliosperma)

Classe - Dicotyledoneae (Magnoliatae)

Sub-classe - Methachlamideae (Asteridae)

Ordem - Tubifloreae (Lamiales)

Sub-ordem - Verbenineae

Família - Verbenaceae

Sub-família - Verbenoideae

Tribo - Verbeneae (Lantaneae)

Sub-tribo - Euverbeneae

Gênero - *Lippia*

Espécie - *Lippia alba* N.E. Brown

A família Verbenaceae à qual pertence *L. alba* compreende 100 gêneros que se estendem entre as regiões tropical e subtropical do globo, sendo a composição dos óleos essenciais dessas plantas bastante variada (Craveiro et al., 1981b). Esses autores citam diversas espécies de *Lippia* com óleos essenciais: *L. aristata*, *L. sidoides*, *L. alnifolia*, *L. grata*, *L. thymoides*, etc.

2.3.2. Sinonímia popular

L. alba ocorre no Brasil, em todas as regiões, onde possui diversificada sinonímia: carmelitana, erva cidreira do campo, salva do Brasil (região norte), cedrilha, cidro (região nordeste), falsa-Melissa (região sudeste), alecrim-do-campo, cidrão, cidrilha, salva-brava, salva-limão, sálvia e salvia-da-gripe (no Sul). E também cidra, lípia, malmequer-do-mato, malva, salva, salva-do-mato e tomilho-silvestre (Correa, 1992).

Andrade (s/d) cita ainda outros termos usados popularmente, para essa planta, no Brasil, como cidrila, câmara, capitão-do-mato, chá-de-febre, chá-de-pedestre, chá-de-tabuleiro, chá-de-frade e chá-do-Rio-Grande-do-Sul. Por sua vez, Scheffer (1989) acrescenta: alecrim e cidreira brava. Em outros países, onde também ocorre naturalmente, *L. alba* pode também ser encontrada como cidrila, orégano e sálvia (países latinos), oroquez morada (México), cedron, verbena, verbena aromática, yerba Luisa, yerba de la princesa (Argentina).

2.3.3. Óleos essenciais de *L. alba*

Os estudos dos constituintes do óleo essencial de *L. alba* foram conduzidos por diversos autores. Resultados de testes histoquímicos, realizados a partir de extrato aquoso de folhas de *L. alba* originárias do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, indicaram: óleo essencial - presente em todo o mesófilo, nos pelos glandulares e nas células oclusivas dos estômatos; amido - presente no mesófilo, no parênquima clorofiliano da nervura e ao redor do sistema vascular da nervura; cristais - drusas de oxalato de cálcio no parênquima cortical da nervura e no colênquima subepidérmico (raro). Cristais prismáticos no mesófilo ocorrem, mas são raros; gorduras - presentes nos pelos glandulares; saponinas - nos pelos glandulares e no mesófilo; taninos e alcalóides - ausentes (Correa, 1992).

E, como marcha fitoquímica, obteve-se: cor - castanho escuro; odor - adocicado; sabor - amargoso, com traço cítrico; pH - entre 7 e 8; extrato seco (%) - 5,4; cristais no extrato seco; heterosídeos antociânicos; heterosídeos saponínicos; ácidos fixos, gomas, mucilagens e taninos.

Ming (1992) relata que os resultados obtidos no estudo dos principais componentes do óleo essencial de *L. alba* nem sempre são os mesmos, devido ao efeito dos fatores ambientais e metodológicos utilizados pelos diferentes autores. Mas, têm-se como principais os seguintes componentes:

→ **τ terpineno** - $C_{10}H_{16}$ (*p*-mentadieno - 1,3). É uma mistura de três isômeros:

α terpineno, τ terpineno e β terpineno;

→ **Citral** - $C_{10}H_{16}O$; é composto por 2 isômeros: o geranial (2 trans - 3,7 - dimetil - 2,6 - octadien - 1 - al) e o neral (2 cis - 3,7 - dimetil - 2,6 - octadien - 1 - al). Praticamente insolúvel em água e solúvel na maior parte dos solventes orgânicos;

→ **β cariofileno** - $C_{15}H_{24}$ - (4,11,11 trimetil - 8 metilenebiciclo [7,2,0] undec - 4 - eno). Solúvel em álcool, insolúvel em água;

→ **β mirceno** - $C_{10}H_{16}$ (7 metil - 3 - metileno - 1,6 - octadieno). Praticamente insolúvel em água; solúvel em álcool, clorofórmio, éter e ácido acético glacial; de odor agradável;

→ ***p*-cimeno** - $C_{10}H_{14}$ (*p*-isopropiltolueno ou metilisopropinil-benzeno). Solúvel em álcool e éter; insolúvel em água;

→ **Undecanona** - $C_{11}H_{22}O$ (metilnonilcetona). Insolúvel em água, solúvel na maioria dos solventes orgânicos;

→ **Cadineno** - $C_{15}H_{24}$;

→ **Copaeno** - $C_{15}H_{24}$;

→ **Careno** - $C_{10}H_{16}$ (isodipreno);

→ **α - humuleno** - $C_{15}H_{24}$ (tetrametilcicloundecatrieno, α - cariofileno).

Gomes³ et al. (s/d), através de análise por cromatografia gasosa do óleo essencial de *Lippia alba*, cultivada em Colombo - PR, obtiveram como componentes predominantes dessa planta: terpineno (46,71 %), *p*-cimeno (8,65 %), β -cariofileno (7,23 %), mirceno (1,32 %), geraniol (0,69 %) e neral (0,39 %). A partir de ensaios preliminares, a marcha sistemática fitoquímica, comprovou-se forte odor aromático nas folhas e predominância de compostos aminados, esteroidais, terpênicos e fenólicos. O índice de refração foi de 1,476 e a densidade relativa de 0,8931. Segundo os autores, esses resultados foram semelhantes aos observados em plantas nordestinas - densidade, índice de refração e composição química. Através da marcha sistemática fitoquímica com folhas e caules de *L. alba*, foi encontrada em sua composição amino grupos, esteróides e/ou triterpenos, ácidos orgânicos, fenóis, oses, osides e quantidades pequenas de antocianos e taninos condensados (em caules somente).

Em estudo químico e farmacológico de quatorze espécies silvestres de *Lippia* nativas no nordeste brasileiro, análises feitas através de cromatografia a gás, em coluna capilar acoplada a espectrometria de massa, apresentaram a seguinte composição química: δ -cadineno, τ -cadineno, car-3-eno, cis-cariofileno, β -cariofileno, *p*-cimeno, α -copaeno, β -elemeno, geranial, humuleno, mirceno, neral,

³ GOMES, E.C. et al. (U.F.PR) Constituintes do óleo essencial de *Lippia alba* (Mill) N.E.Br. (Verbenaceae). Correspondência pessoal. s.d.

τ terpineno, undecanona. Dessas substâncias, undecanona, neral e α -cadineno foram encontradas somente em *Lippia alba* entre as quatorze plantas de *Lippia* analisadas. Os compostos que apresentaram-se em maior concentração foram *p*-cimeno, τ -terpineno e β -cariofileno (Bezerra et al., 1981).

Análises do óleo essencial de *L. alba* coletadas no mês de outubro, no Maranhão, apresentou como principais constituintes car-3-eno (0,8%), mirceno (2,5%), τ -terpineno (1,2%), *p*-cimeno (0,8%), geranial (12,9%), neral (9,6%), τ -cadineno (0,7%), α -cadineno (2,4%), β -cariofileno (24,3%), α -copaeno (1,8%), β -elemeno (1,5%), τ muuroleno (0,4%), α -humuleno (2,2%) e 2 undecanona (9,0%) e outros não identificados (Craveiro et al., 1981a). Já Andrade (s/d) relata a presença de limoneno (10-18%), cineol, citronelal e geranial no óleo essencial. Também no Maranhão, para folhas de *Lippia alba* coletadas em outubro, Bezerra et al. (1981), relatam os seguintes compostos: δ -cadineno, τ -cadineno, car-3-eno, β -elemeno, geranial, humuleno, mirceno, neral, τ -terpineno e undecanona.

2.3.4. Uso de *L. alba* na medicina popular

No Brasil, o uso de *L. alba* corresponde ao da erva cidreira - *Melissa officinalis* - e da salvia - *Salvia officinalis* L. (Correa, 1984). No nordeste, a raiz é usada como aperiente e para combater infecções hepáticas (Braga, 1976).

O chá das folhas de *L. alba* é utilizado como antiespasmódico, estomáquico, carminativo, relaxante do sistema nervoso (Albuquerque, 1989), emenagoga (Correa, 1984) e contra intoxicações em geral (Di Stasi et al., 1989). Diz-se que aplicando-se folhas frescas de *L. alba* sobre as pálpebras, ocorre melhora das dores em casos de inflamação. É indicada também para mau-hálito, má-circulação sanguínea, palpitações, pericardite e vertigens (Vieira, 1992).

Na medicina popular *L. alba* é usada para fins estomáquico, digestivo, calmante, diurético, peitoral, sudocífero, anti-catarral, contra dores de estômago e de garganta, problemas hepáticos, anti histerismo, azia, mal estar e gastrite. Pode ser usada na forma de infuso, tintura, banhos, cataplasmas e inalação (Andrade s/d). O infuso e a tintura das folhas são utilizados principalmente como sedativo, antiespasmódico e estomáquico (Andrade, s/d; Craveiro, 1981a; Di Stasi et al., 1989), o que vêm sendo atribuído ao óleo essencial, encontrado nesses tecidos (Andrade s/d; Bezerra et al., 1981; Elanovick, 1987; Gomes, 1990).

Angelucci et al. (1990), através de ensaio aquoso com folhas secas de *L. alba*, observaram ação espasmódica em duodeno de rato, íleo terminal de cobaia e contração intensa do útero de ratas virgens tratadas com estrógeno. Houve ainda interferência na redução do tempo de indução do sono em 49,3% e no aumento de duração do sono em 70,2%. Em alguns experimentos paralelos houveram semelhanças de respostas comparativamente a extratos de *Melissa officinalis*, obtidos de folhas secas.

L. alba, juntamente com duas outras espécies *L. grandis* e *L. citrifolia*, é indicada para banhos de imersão, técnica difundida em aromaterapia, pois a composição química de seu óleo essencial, apresenta como principais componentes voláteis, carvacrol e seu metil derivado, timol e carvona, substâncias conhecidas pela ação bactericida e antisséptica (Maia et al., 1994).

2.3.5. Óleos essenciais de *L. alba* e fitopatógenos vegetais

Kishore et al. (1983), testando o óleo essencial de 22 plantas, obtido a partir de hidrodestilação, através do método de placa invertida contra *R. solani*, o patógeno do "damping-off", verificaram que somente o óleo essencial de *Lippia alba* causava inibição completa do crescimento micelial. O efeito inibitório máximo do óleo essencial de *L. alba* foi de 0,5% e a concentração mínima inibitória desse óleo para o fungo foi de 1000 ppm. O óleo mostrou também amplo espectro antifúngico, causando inibição de outros 12 fungos testados: *Absidia ramosa*, *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *Chaetomium globosum*, *Cladosporium cladosporioides*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. dermatium*, *Curvularia lunata*, *Penicillium italicum*, *Rhizopus arrhizus*. O óleo essencial de *L. alba* não apresentou fitotoxicidade com respeito à germinação e o crescimento de plântulas de *Phaseolus aureus*. Com base nas propriedades do óleo

essencial de *L. alba* - atividade fungicida, amplo espectro fungitóxico e ausência de fitotoxicidade para as plantas (*Phaseolus aureus*) - sugere-se que o mesmo pode ser empregado como um metabólito fungitóxico no tratamento de sementes contra *R. solani* e vários outros fungos.

Kishore & Mishra (1991), trabalhando com 20 óleos essenciais de plantas, para verificar a ação na germinação de escleródios de *R. solani*, verificaram que o óleo de *Chenopodium ambrosioides*, *Lippia alba*, *Melaleuca leucadendron* e *Ocimum grattissimum* promoveram inibição da germinação após 60 min de tratamento e que o óleo de *Ageratum houstonianum*, *Eucalyptus citriodora* e *Nepta hindostana* possuíam a mesma ação após 120 min.

Óleos essenciais de 10 plantas: cidreira, *Seseli indicum*, *Juniperus* sp., *Cinnamomum camphora*, *Eupatorium cannabinum*, *Vitex negundo*, *Callistemon lanceolatus* (*C. citrunus*), *Cymbopogon* sp., laranjeiras e *Lippia alba*, foram testados a 500, 1000 e 2000 ppm contra *Macrophomina phaseolina*, fungo que infecta diversas culturas. Na concentração de 2000 ppm somente o óleo de *L. alba* causou completa inibição do crescimento micelial, enquanto que o óleo de *Juniperus* sp. causou 98,2% de inibição nessa concentração (Dwivedi et al., 1990).

2.4. *Colletotrichum gloeosporioides*

2.4.1. Descrição e importância

As doenças causadas por *Colletotrichum gloeosporioides* em citros incluem a queda do fruto jovem e a antracnose pós-colheita, que se desenvolve na casca de frutos de cultivares suscetíveis.

As colônias do fungo mostram-se branco acinzentadas a preto acinzentadas, dependendo da idade; exibindo a presença ou não de setas; apressório clavado, ovóide, subovóide, algumas vezes lobado; sépia marrom, 6-20 x 4-12 μm . Os conídios são formados em massas cor salmão pálida, retos, cilíndricos, ápice obtuso, base truncada, 12-17 x 35-6 μm (Sutton, 1992). As espécies do gênero *Colletotrichum* são heterogêneas sendo que suas características variam em demasia em culturas; possuem apressório morfolologicamente bem definidos (Emett & Parbery, 1975).

Instalado o processo de infecção, os conídios de *C. gloeosporioides* germinam na superfície do hospedeiro (folhas, ramos, frutos) e formam apressório, o qual torna-se firmemente aderido à cutícula. Uma restrita hifa de infecção cresce do apressório para o interior da cutícula, cessando aí o seu crescimento; a hifa pode também crescer intercelularmente, ganhando espaço até três células tornando-se

então, imóvel. Após a morte das células do hospedeiro, ou mesmo o enfraquecimento destas por algum outro fator, as hifas novamente prosseguem no seu crescimento e, rapidamente produzem os corpos de frutificação (acérvulos), característicos da antracnose (Whiteside et al., 1989). Com exceção, portanto, dessas duas situações citadas acima, *C. gloeosporioides* raramente promove um quadro de doença (Whiteside et al., 1989; Feichtenberger, 1991). É, portanto, considerado um invasor oportunista.

Na doença queda de frutos jovens de citros, o agente causal é uma raça virulenta desse fungo, que difere morfológicamente de isolados de *C. gloeosporioides*. Feichtenberger (1991) relata que essa raça mais virulenta apresenta diferenças morfológicas tais como, crescimento mais lento em cultura, coloração mais clara (branca ou cinza claro), produção de grande massa de esporos de coloração alaranjada e ausência ou reduzido número de setas, quando comparada com isolados desse fungo, invasores comuns dos tecidos de citros em geral. Inóculos dessa raça encontram-se geralmente misturados com numerosas outras que provocam infecções latentes, do tipo não virulenta, nas superfícies das folhas. Em condições de molhamento prolongado, consideradas ideais, as hifas localizadas abaixo da cutícula produzirão acérvulos e darão continuidade à infecção (Whiteside et al., 1989).

2.4.2. Queda de frutos jovens em citros

2.4.2.1. Importância e ocorrência

A doença da queda de frutos jovens de citros foi relatada pela primeira vez em 1956 em Belize. Desde então foi relatada na Argentina, Brasil, Colômbia, Dominica e Panamá. Em Belize, as perdas da cultura foram estimadas em até 65 % (Feichtenberger, 1991; Whiteside et al., 1989). A importância dessa doença vem aumentando ano a ano sendo, atualmente, incluída entre as principais doenças fúngicas da cultura no Estado de São Paulo, devido aos sérios prejuízos causados nos pomares cítricos (Feichtenberger, 1991; Prates, 1991). Todas as variedades de laranjeira são afetadas, principalmente as do grupo "umbigo", e o limoeiro Tahiti (Prates, 1991).

A doença no Brasil, de acordo com Feichtenberger (1991), tem causado maiores perdas em limoeiro Tahiti, limoeiros verdadeiros (Siciliano, Femminello e Eureka) e laranjeiras doces. Variedades cítricas que possuem vários surtos de floração também são mais atingidas, pois essas infecções causadas na floração precoce contribuiriam para um aumento exponencial do patógeno, aumentando a severidade da doença nas floradas principais.

2.4.2.2. Sintomas

Os primeiros sintomas aparecem nas pétalas, com formação de lesões encharcadas (anasarcas), de coloração alaranjada (Whiteside et al., 1989; Feichtenberger, 1991), que podem ocorrer em flores abertas ou não. Em seguida, formam-se frutificações do fungo (acérvulos), de coloração salmão-rosa, que desenvolvem-se rapidamente, se as condições forem favoráveis, estendendo-se para toda a pétala. As pétalas tornam-se então rígidas e secas, de coloração rosa-parda e firmemente aderidas ao eixo basal (Feichtenberger, 1991; Whiteside et al., 1989).

Os frutos pequenos, cessado o florescimento, amarelecem, se desprendem e caem, permanecendo os eixos basais, os cálices e pendúnculos fortemente aderidos ao ramo da planta. Os ramos que possuem esses cálices, deixam de florescer nos anos seguintes (Prates, 1991) ou suas floradas são prejudicadas (Feichtenberger, 1991). Os cálices retidos continuam a crescer, adquirindo aspecto de estruturas dilatadas - "estrelas ou estrelinhas" - (Feichtenberger, 1991). Quando a infecção se dá durante ou logo após a abertura floral, os frutinhas podem permanecer ligados aos ramos, sem cair. Nesse caso, permanecem pequenos, geralmente menores do que 1 cm de diâmetro, e deformados (Feichtenberger, 1991).

Entre a germinação dos esporos e a infecção dos tecidos das pétalas decorrem, no mínimo, 12 a 18 horas. Em condições ótimas de umidade (2 a 3 dias),

Condições climáticas ideais para a ocorrência da doença parecem se dar quando o período de florescimento das plantas coincide com períodos de prolongada pluviosidade (Feichtenberger, 1991), o que a torna grave se, num período úmido, normalmente de 2 a 3 dias, a precipitação pluviométrica for superior a 25 mm (Porto, 1981).

No Estado do Rio Grande do Sul, a doença ataca todas as variedades de interesse comercial, provocando perdas em certos anos, de até 75%. Presente também em Sergipe, onde causa severos danos, e em São Paulo, principalmente nas regiões citrícolas de Limeira, Araraquara, Taquaritinga e Cândido Rodrigues, causou sérios prejuízos na safra de 77/78 e nas regiões de Campinas e Sorocaba, nas safras de 90/91, sempre que chuvas contínuas ocorreram durante o período de florescimento das plantas (Feichtenberger, 1991).

Fagan (1984) verificou que a dispersão dos conídios é beneficiada por gotas de chuva, gotículas de orvalho e correntes de ar e sugere que a disseminação do inóculo é auxiliada por insetos.

Locais próximos a rios, lagos ou reservatórios de água e mesmo pomares irrigados por aspersão, são locais onde a incidência da doença pode ser maior, assim como em locais de pouca aeração (Feichtenberger, 1991).

cerca de 90% das flores são infectadas (Feichtenberger, 1991; Whiteside et al., 1989).

2.4.2.3. Controle

Pulverizações antes da abertura das flores com benomyl visando a proteção das flores, é uma das formas de maior eficiência no controle da doença. Chlorothalonil e thiabendazol são também recomendados (Feichtenberger, 1991; Prates, 1991; Whiteside et al., 1989), mas com menor eficiência (Feichtenberger, 1991). Esse controle deve ser feito principalmente nas regiões onde a umidade prevalece e coincide com o período de florescimento ou naquelas variedades que apresentam vários períodos de florescimento.

2.4.3. Apressório

2.4.3.1. Importância

O apressório é parte integrante do processo de infecção de muitos fungos parasitas (Amorim, 1995). Em várias espécies, a formação de apressório pode ser obrigatória para a infecção, enquanto que, em outros pode ser opcional ou

desnecessário (Emett & Parbery, 1975). A função principal do apressório é auxiliar na penetração da hifa para o interior dos tecidos de um hospedeiro. Para isso, o apressório deve unir-se firmemente à superfície do hospedeiro e produzir uma hifa de infecção que ultrapasse a cutícula e geralmente a parede celular. Os diferentes tipos de apressórios podem ser divididos em dois grupos: i) **apressórios simples**: formados de uma única célula modificada e, ii) **apressórios compostos**: formados a partir de muitas células (Emmett & Parbery, 1975).

2.4.3.2. Formação

Enquanto vários autores relatam a formação do apressório como um processo independente e especializado em fungos, Emmett & Parbery (1975) consideram que há interferência da expressão genotípica durante a fase final da germinação do apressório. Isso seria evidenciado também pelo padrão de desenvolvimento do apressório em muitos fungos, tanto, que é possível associar formas de apressórios morfologicamente constantes, com as espécies de fungos correspondentes. Entretanto, segundo os mesmos autores, em alguns grupos particulares de fungos, a expressão do genótipo básico pode requerer condições ambientais bem definidas, geralmente envolvendo contato com uma superfície (tigmotropismo), bem como presença ou não de luz, temperaturas adequadas, etc.

A interação genótipo - ambiente, de acordo com Lumsden & Dow (1973), cria um balanço metabólico dentro do fungo, o qual determinará se ou quando o apressório será formado. Dessa forma, pode-se dizer que as condições ambientais durante o crescimento vegetativo podem influenciar a formação do apressório.

Variações na morfologia do apressório podem ocorrer devido à diferenças nos isolados (Kerr & Flentje, 1957), ou no hospedeiro (Yarwood, 1957), ou mesmo no ambiente (Boyle, 1921). Para Emmett & Parbery (1975), a evolução do apressório em muitos fungos, parece evidenciar uma proteção para um estágio vulnerável de seu ciclo de vida, à mudanças ambientais, que poderiam impedir o estabelecimento de sua relação com o hospedeiro.

O ambiente da superfície vegetal - superfície de contato sólida, a presença de nutrientes, constituintes químicos das ceras e cutículas, etc, presença de aerossóis (Rasmussen & Went, 1965), poluentes (Heagle, 1973) junto ao hospedeiro pode ser decisivo na formação ou não de apressórios. A dureza da superfície pode, as vezes, ser crítica. Uma superfície dura aumenta, a germinação de conídios de *C. gloeosporioides* produzindo proporcional aumento de apressórios formados (Van Burgh, 1950). O início do processo de formação do apressório ocorre quando cessa a elongação do tubo germinativo ou hifa e ocorre a dilatação do ápice do mesmo (Emmett & Parbery, 1975). Vários trabalhos relatam que isso pode ocorrer quando há o contato do ápice da hifa (ou tubo germinativo) com a superfície do hospedeiro.

2.4.3.3. Relação apressório x hospedeiro

Bailey et al. (1992) relatam a existência de evidências de que a natureza química da superfície do hospedeiro favorece a formação do apressório. A presença de nutrientes pode aumentar a taxa de germinação de esporos, mas mesmo pequenas quantidades frequentemente impedem a formação de apressórios (Mercer et al., 1971).

Mudanças nas estações (Di Menna, 1971) e na idade (Blackeman, 1971; Sinha, 1971; Sharma & Sinha, 1971) do hospedeiro podem influenciar indiretamente na suscetibilidade, devido a exudação de compostos hidrofílicos das ceras para a superfície vegetal (Blackeman, 1971). Algumas plantas também contêm nas cutículas, substâncias que são fungistáticas (Preece et al., 1967) ou fungitóxicas (Martin, 1964; Pascholati & Leite, 1995).

Substâncias químicas internas e externas à planta podem influenciar a formação de apressórios. Pode ser difícil, entretanto, determinar a fonte de um componente químico que esteja influenciando a formação do apressório em um caso particular. É possível também que certos íons metálicos possam influenciar a formação dos apressórios (Emmett & Parbery, 1975). Em *Puccinia coronata*, zinco parece ser especificamente requerido para o desenvolvimento do apressório (Sharp & Smith, 1953). Entretanto, Willians (1971), trabalhando com a mesma espécie, mas provavelmente com raças diferentes, obteve apressórios na ausência desse elemento.

A inibição da formação de apressório por nutrientes não precisa sempre ser devida a inibidores específicos ou concentrações inibitórias. O apressório é uma estrutura que possibilita a um fungo estabelecer uma relação nutricional com um hospedeiro, de modo que, em alguns fungos a iniciação do apressório é possivelmente uma resposta à exaustão de reservas de energia endógena (Emmett & Parbery, 1975). Estados de inanição foram propostos como iniciadores da formação de apressórios em espécies de *Colletotrichum dematium* (Dunkle et al., 1970) e *C. gloeosporioides* (Biraghi⁴ citado por Emmett & Parbery, 1975).

A necessidade de nutrientes na superfície foliar para o completo desenvolvimento de apressórios foi observada para *R. solani* e *Erysiphe cruciferarum* (Emmett & Parbery, 1975).

A impossibilidade de *Glomerella cingulata* produzir apressório em folhas danificadas de *Ginkgo biloba* foi atribuída a excesso de nutrientes (Adams et al., 1962), o que pode, entretanto, ser decorrente de algum inibidor contido na seiva. Por sua vez, espécies de *Colletotrichum* frequentemente respondem à nutrientes exógenos pela continuidade de elongação do tubo germinativo e retardamento na formação de apressório. Estresses nutricionais e externos frequentemente favorecem a formação de apressórios (Emmett & Parbery, 1975).

⁴ BIRAGHI, A. On the biological significance of alleged appressoria of the genus *Gloeosporium*. **Boll. Stn. Patol. Veg.** Rome, v. 14, n.2, p.202-10. 1934.

Swinburne & Brown (1983) verificaram que agentes quelantes de ferro aceleram a formação de apressórios em *C. musae*, realçando a porcentagem de conídios que produzem apressórios. Independentemente, conídios de *C. musae* e *C. acutatum* germinaram em baixas taxas quando foram produzidos em meio contendo elevadas concentrações de ferro. Esses resultados sugerem que um balanço entre a disponibilidade de ferro durante a esporulação e sua quelação durante a diferenciação nas superfícies das plantas, possui um efeito sensível no desenvolvimento de doenças causadas por muitas espécies de *Colletotrichum*, mesmo que esses resultados tenham sido relatados até agora para poucas espécies (Swinburne⁵, citado por Bailey et al., 1992).

Harper et al. (1980) em experimentos com conídios de *C. musae*, produzidos em meios com diferentes concentrações de ferro, verificaram que há uma correlação inversa entre a porcentagem de germinação dos conídios e a concentração de ferro nos mesmos, o que levaria à inibição da germinação. Verificaram ainda que essa inibição não era diminuída por diferentes agentes quelantes.

⁵ SWINBURNE, T.R. Stimulation of disease development by siderophores and inhibition by chelated iron. In: _____ ed, **Iron, siderophores and plant disease**. New York and London: Plenum Press. p.217-26. 1986.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Fisiologia do Parasitismo e nas dependências do Campo Experimental do Departamento de Fitopatologia da ESALQ/USP, em Piracicaba, SP.

3.1. Obtenção do material vegetal

As duas formas de *L. alba*, obtidas a partir da coleção de plantas medicinais do Departamento de Horticultura da Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP/Botucatu-SP, foram enviadas para identificação ao "Royal Botanic Gardens", em Kew, Inglaterra. A partir desses materiais vegetais, foram feitas 100 estacas de 0,20 m de comprimento de cada forma de *L. alba*, que plantadas em bandejas de isopor, permaneceram em casa de vegetação até o pegamento (cerca de 30 dias), sendo então colocadas em condições de campo em lotes separados, num espaçamento de 1,00 m entre plantas e 0,70 m entre linhas. Durante o cultivo foram feitas capinas manuais para a retirada de plantas invasoras. Foram coletadas amostras de solo a 0,20 m e 0,40 m para análises de micro e macronutrientes.

A colheita do material vegetal - folhas - foi efetuada após 4 meses do plantio (Ming, 1992). Foram realizados cortes dos ramos a 0,30 m do solo, sendo o material pesado imediatamente (P.F.) e colocado para secar em local arejado e sombreado. Após a completa secagem, foi feita a desfolha manual dos galhos, nova pesagem (P.S.), e armazenamento das folhas em sacos de poliestireno pretos. A partir desse material (20 folhas ao acaso) foram efetuadas análises foliares para micro e macronutrientes junto ao Laboratório de Análise de Plantas do Departamento de Ciência do Solo da ESALQ/USP.

3.2. Germinação e formação de apressório por *C. gloeosporioides* sobre membrana de poliestireno

Através do uso de suspensão de conídios de *C. gloeosporioides* (1×10^5 conídios/ml) isolado a partir de flores infectadas de laranjeira doce, foi realizado teste de germinação *in vitro* dos conídios obtidos pela lavagem de cultura crescida em placa de Petri contendo meio BDA (batata-dextrose-água), com 10 dias de idade, e mantida em câmara de crescimento à temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12h luz UV longo ("Black light") e 12h escuro. A suspensão de conídios foi filtrada através de duas camadas de gaze e gotejada (3 gotas de $40 \mu\text{l}$) sobre lâminas recobertas com membranas de poliestireno (Leite, 1992; Leite & Nicholson, 1992).

Em seguida, cada lâmina foi colocada em uma placa de Petri, contendo algodão embebido em água destilada e mantida em câmara de crescimento nas mesmas condições de crescimento. As lâminas foram preparadas com poliestireno, pela imersão das mesmas em solução de acetato de amila contendo o polímero (1 placa de Petri com 9 cm de diâmetro dissolvida em 50 ml de acetato de amila).

O crescimento fúngico foi paralisado com azul de algodão em lactofenol (Tuite, 1969) 6, 12, 18 e 24 horas após o gotejamento das lâminas. Cada período de tempo correspondeu a um tratamento (6h = T_1 , 12h = T_2 , 18h = T_3 e 24h = T_4), equivalente à 2 lâminas contendo 3 gotas de suspensão de conídios cada, totalizando, portanto, 6 repetições. A contagem dos conídios, tubos germinativos e apressórios presentes foi realizada em microscópio ótico e expressa em porcentagens de germinação e formação de apressórios.

3.3. Germinação e formação de apressórios por conídios de *C. gloeosporoides* em contato com discos de folhas secas de *L. alba*

3.3.1. Desinfecção do material vegetal

Discos de 1,2 cm de diâmetro, obtidos a partir de folhas secas das duas variedades - F1 e F2 - de *L. alba* através de um vazador cortante, foram

submetidos a um teste de desinfecção visando a otimização desse processo. Para tanto, esses discos foram lavados sucessivamente com: a) água destilada (60 s); b) álcool 70% (30 s); c) hipoclorito de sódio : água (2:1) (durante 30, 60 e 120 s) ou hipoclorito de sódio : água (3:1) (durante 30, 60 e 120 s); d) 4 lavagens sucessivas em água destilada estéril (60 s cada), totalizando 6 diferentes tratamentos (7 lavagens cada). Todo excedente líquido entre cada lavagem foi escoado dos discos. A seguir, os discos foram colocados em placas de Petri contendo meio BDA (4 discos/placa) sendo cada tratamento representado por 5 placas (5 repetições). Após a identificação e vedação através de filme de PVC, essas placas foram colocadas em câmara de crescimento à temperatura de $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ sob luz fluorescente constante, por 96 horas. O tratamento que apresentou a menor taxa de contaminação foi utilizado para a desinfecção dos discos de folhas nos demais testes realizados.

3.3.2. Discos de folhas de *L. alba* - F1. e F2. x *C. gloeosporioides*

Foram montadas 10 lâminas com película de poliestireno (Leite, 1992), com 3 gotas de 40 μl de suspensão de conídios de *C. gloeosporioides* cada. A suspensão de esporos foi obtida segundo descrito no item 3.2. Dessas 10 lâminas montadas, 4 receberam discos de folhas de *L. alba* F1. e 4 receberam discos de folhas de *L. alba* F2., sendo um disco sobre cada gota (3 gotas/lâmina; 3 discos/lâmina). Os discos de folhas, tendo sido previamente desinfectados a partir

do melhor tratamento obtido em 3.3.1., foram colocados sobre cada lâmina após 4 diferentes períodos de tempo do gotejamento da suspensão de conídios, correspondendo, portanto, a 4 tratamentos: T_1 - 0 min. (imediatamente após o gotejamento); T_2 - após 30 min.; T_3 - após 60 min.; T_4 - após 120 min. As duas lâminas de poliestireno restantes e que receberam a suspensão de conídios, serviram como tratamento testemunha e corresponderam ao Tratamento 5.

A seguir, todas as lâminas foram colocadas, individualmente, em uma placa de Petri contendo algodão embebido em água destilada (câmara úmida), embaladas em sacos plásticos transparentes e vedados, sendo então colocadas em câmara de crescimento à temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$, sob fotoperíodo de 12 h luz U.V. longo ("Black light") e 12 h escuro. Após 19 horas, foram retirados os discos de folhas de todas as lâminas e cada gota de suspensão de conídios recebeu uma gota de azul de algodão em lactofenol e uma lamínula para a posterior contagem do número de conídios germinados e de apressórios formados, feita em microscópio ótico. Medidas do comprimento e da largura do tubo germinativo de conídios germinados (50 medidas/repetição) foram efetuadas nos tratamentos 1 e 4 e também no tratamento 5. Essas medidas foram obtidas através do uso de microscópio ótico Leica Galen, na objetiva de 40 x e micrômetro "Fillar Micrometer Eyepiece Bausch & Lomb" com ocular 10, perfazendo um aumento de 400 X.

3.3.3. Microscopia eletrônica de varredura

As lâminas com película de poliestireno, referentes aos tratamentos 1,4 e 5 foram fixadas com 200 μ l de fixador (glutaraldeído 2%, paraformaldeído 2%, tampão cacodilato 0,05 M e CaCl_2 0,01 M), após a retirada dos discos foliares. Após 2 horas, foram lavadas (2x) com água destilada. Em seguida, a superfície de poliestireno, no local da gota de suspensão de conídios foi recortado da lâmina de vidro com o auxílio de uma lâmina de barbear, sendo aderida nos "stubs" de metal, através de fita de carbono dupla face. Os "stubs" foram então submetidos à série etanólica gradual (30°, 50°, 60°, 70°, 80°, 90° e 100°) durante 15 min em cada série, sendo que a última (100°) foi repetida 3 vezes. Em seguida, o material montado nos "stubs" foi seco em aparelho de secagem ao ponto crítico (Balzers CPD 030) com CO_2 e metalizado com ouro em evaporador (MED 010 Balzers Union) por 160 s. A observação foi realizada em microscópio eletrônico de varredura (DSM 940 A Zeiss) sob aceleração de 10 KV, junto ao Centro de Microscopia Eletrônica da ESALQ/USP.

3.4. Germinação e formação de apressórios por conídios de *C. gloeosporioides* em contato com extratos de *L. alba*, em superfície de poliestireno

Os extratos foram obtidos a partir de acetona, etanol e hexana, solventes de diferentes polaridades. As extrações em acetona, etanol e hexana foram realizadas em aparelho de Soxhlet, no Departamento de Economia Doméstica e Alimentos, junto ao Laboratório de Nutrição Humana e Alimentos, da ESALQ/USP. Para cada extração, foram utilizadas 100 g de folhas secas trituradas em liquidificador industrial por 5 min, e um litro de solvente. O tempo total de extração foi o de aproximadamente 12 horas. A seguir, cada extrato foi submetido a evaporação a vácuo em evaporador rotativo, sob diferentes temperaturas para cada solvente: 70°C (acetona); 90°C (etanol) e 70°C (hexana). Os resíduos obtidos foram eluídos com 150 ml de cada solvente. Após filtragem, através de filtro de papel Whatman nº 1, alíquotas de 10 ml de cada extrato foram esterilizadas através do uso de filtros estéreis (S. & S. Resist 30/0,2; 0,2 µm/PTFE) acoplados à seringas estéreis descartáveis de 20 ml. O filtrado esterelizado foi armazenado em tubos de ensaio estéreis com tampa.

Os extratos acetônicos, etanólicos e hexânicos das duas formas - F1 e F2 - de *L. alba*, obtidos como descrito acima, foram diluídos em água destilada

estéril, assim como os seus solventes básicos - acetona, etanol e hexana -, em 3 diferentes diluições: 1:9 (v/v); 1:99 (v/v) e 1:999 (v/v). Em seguida, foram montados os tratamentos com 54 lâminas recobertas com película de poliestireno, cada uma com 3 gotas de 40 μ l de suspensão de conídios de *C. gloeosporioides* (2×10^5 conídios/ml), com 13 dias de idade, obtida conforme descrito em 3.2. Sobre cada gota de suspensão de conídios foi colocada 1 gota de 40 μ l de uma das concentrações descritas acima, dos extratos ou dos solventes, sendo 2 lâminas para cada diluição (tratamento). Posteriormente, cada lâmina foi colocada em uma placa de Petri contendo algodão embebido em água destilada (câmara úmida) sendo incubadas e avaliadas conforme descrito em 3.2.

3.5. Germinação e formação de apressórios por conídios de *C. gloeosporioides* em diferentes superfícies de contato

A partir de suspensão de conídios obtida conforme descrito em 3.2., verificou-se a germinação de conídios e a formação de apressórios em diferentes superfícies e meios nutrientes. Para tanto, lâminas de microscopia foram recobertas com 3 ml de meio BDA e AA (ágar-água) (3 lâminas/meio) e receberam cada uma, 3 gotas de 40 μ l da suspensão de conídios. Também foi preparada uma suspensão de conídios conforme já descrito, à 0,5% de glicose, que foi gotejada (3 gotas de 40

μl) em 3 lâminas com película de poliestireno. Como testemunha, utilizou-se 3 lâminas de poliestireno, contendo cada uma, 3 gotas de 40 μl da suspensão de esporos sem glicose (Leite, 1992). A seguir, cada lâmina foi colocada em condições de crescimento por 19 horas (item 3.2.), após o qual houve paralização do crescimento fúngico através do gotejamento de azul de algodão em lactofenol para posterior avaliação (item 3.2).

Seguindo a mesma metodologia descrita acima, para o comportamento do fungo em meio BDA e AA e em lâmina de poliestireno (testemunha), após paralização do crescimento em 15 horas, nas mesmas condições de crescimento já descritas em 3.2., foram medidos o comprimento e a largura do tubo germinativo de conídios germinados (50 medidas ao acaso/repetição = 150 repetições), sob microscópio ótico equipado com micrômetro.

3.6. Efeito dos extratos orgânicos e aquoso do tecido foliar de *L. alba* sobre o crescimento micelial de *C. gloeosporioides in vitro*

Os extratos foram obtidos a partir de acetona, etanol, hexana e água, solventes com diferentes polaridades. Os três primeiros extratos foram obtidos de acordo com o procedimento descrito em 3.4.1. O extrato aquoso foi obtido por meio de extrações em aparelho de Clevenger, a partir de 1500 g de folhas secas picadas

manualmente e colocadas em 2200 ml de água destilada. O tempo de extração foi de aproximadamente 5 horas, contadas após o início da destilação. O material oleoso resultante das extrações das duas formas vegetais foi coletado em tubos de microcentrífuga tipo eppendorf, sendo a fração aquosa retirada através de seringas descartáveis estéreis de 1 ml. Alíquotas de 2 ml de cada fração oleosa foram misturadas com 3 ml de água destilada estéril. Após filtração através de papel de filtro Whatman nº 1, alíquotas de 3 ml dessa fração resultante foram esterilizadas a partir de filtros (S. & S. FP 030/30; 0,2 μ m, CA) acoplados à seringas estéreis descartáveis de 5 ml e armazenadas em tubos de ensaio estéreis e vedados, com algodão.

Através de pipeta automática com ponteiros descartáveis estéreis, 1 ml de cada extrato acetônico, etanólico ou hexânico das 2 formas de *L. alba*, foram colocados sobre uma placa de Petri contendo meio de BDA. Foram utilizadas 5 placas para cada extrato, que corresponderam aos tratamentos: T₁ - extrato acetônico; T₂ - extrato etanólico; T₃ - extrato hexânico e T₄ - testemunha, que não recebeu nenhum extrato, totalizando 35 placas. Após a distribuição dos extratos sobre o meio de BDA, com o auxílio de alça de Drigalsky, esperou-se 60 minutos para a completa evaporação dos solventes. A seguir, cada placa recebeu um disco micelial de 0,6 cm de diâmetro de uma cultura de *C. gloeosporioides* com 10 dias de idade, crescida em meio de BDA. Além dos tratamentos já descritos, foram

repicadas 15 outras placas que receberam, cada uma, anteriormente à repicagem (60 min.), 1 ml dos solventes utilizados - acetona ou etanol ou hexana, sendo 5 placas/solvente - servindo como placas controle de cada solvente. Após vedação com filme plástico e identificação, as placas foram colocadas em câmara de crescimento, à temperatura de $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$, sob fotoperíodo de 12 h luz U.V. longa ("Black light") e 12 h. escuro. No caso do extrato aquoso, foram utilizadas alíquotas de 0,5 ml de cada extrato por placa de Petri, utilizando-se a mesma metodologia descrita acima, sendo 5 placas para cada forma de *L. alba* - F1 e F2 - e 5 placas para a testemunha que recebeu 0,5 ml de água destilada estéril.

A avaliação do experimento foi feita através da medição diária do crescimento micelial, sendo que cada medição correspondeu à média de duas medidas diametralmente opostas da colônia fúngica, através de uma régua, a partir de 48 horas da montagem dos experimentos.

3.7. Bioensaio para frações fungitóxicas presentes nos extratos de folhas secas de *L. alba*

Extratos de folhas secas de *L. alba*, nas suas duas formas vegetais, obtidos a partir de acetona, etanol, hexana e água, conforme descrito em 3.4. e 3.6., foram submetidos a um bioensaio para verificar a presença de frações fungitóxicas.

Os extratos foram utilizados nas concentrações obtidas em 3.4 e na concentração extrato/solvente 1:10 (v/v), após filtragem em filtro de papel Whatman nº 1. Para a fração oleosa, obtida a partir da água, foi utilizada a concentração óleo/água destilada estéril 1:17 (v/v) e, a partir dessa concentração, uma nova diluição em 10 partes de água (v/v).

Para a cromatografia de camada delgada, "CCD", foram utilizadas 2 placas de sílica gel flexível Whatman de 20 x 20 cm, com indicador fluorescente (254 nm), sendo uma placa para cada forma vegetal de *L. alba* (Lopez & Pascholati, 1992). Após pré-lavagem com clorofórmio/metanol 1:1 (v/v), amostras de 200 µl de cada extrato, nas concentrações originais e diluídas, foram depositadas nas placas e secas sob fluxo de ar. A separação dos compostos foi obtida através do uso de sistemas de solventes butanol/ácido acético/água (6:1:2). Os compostos foram visualizados sob luz visível e sob luz U.V. curta. A seguir, essas placas foram aspergidas com uma suspensão de conídios de *C. gloeosporioides* (10^5 conídios/ml do meio líquido de Czapek) e incubadas sob umidade relativa de 100% à $25 \pm 1^\circ\text{C}$ (Martins et al., 1986). Após 48 horas, as placas foram observadas para visualização das zonas de inibição representadas por áreas claras, sem crescimento micelial.

3.8. Determinação do conteúdo de proteínas e carboidratos totais

O conteúdo de proteínas e carboidratos totais em folhas secas das duas formas de *L. alba* - F1 e F2 - foi determinado a partir de amostras de 2 discos foliares de 1,0 cm de diâmetro, obtidos através de um vazador cortante e desinfectados pelo melhor tratamento de desinfecção obtido em 3.3.1. Além disso, foi determinada a lixiviação desses compostos a partir da análise de 5 ml de água destilada e estéril, que por 19 horas estiveram em contato com 125 discos de 0,60 cm de diâmetro, obtidos e desinfectados conforme descrito acima, nas mesmas condições de crescimento de *C. gloeosporioides*.

Para a quantificação do teor de proteínas totais, foi utilizado o método descrito por Bradford (1976). Para tanto, as amostras de tecido vegetal foram colocadas em tubos de ensaio contendo 5 ml de tampão fosfato 0,01 M (pH = 6,0), trituradas em um homogeneizador por 30 s e filtradas, à vácuo, em filtro de papel Whatman nº 40. Em seguida, o homogenato foi centrifugado (20.000 g/2,5 min a 4°C) e o sobrenadante coletado com pipeta "Pasteur". A seguir, 0,8 ml da amostra foi misturada, sob agitação, com 0,2 ml de reagente de Bradford concentrado. Após 5 min, realizou-se a leitura da absorbância a 555 nm, em espectrofotômetro. As alíquotas provenientes da lixiviação foram dosadas, seguindo-se o mesmo procedimento, com exceção do volume da amostra que consistiu em 1 ml.

A concentração de proteínas totais encontrada nos discos foliares e na água foi expressa em miligrama de proteína/grama de peso seco de folha de *L. alba*, utilizando-se curva padrão de concentrações de ASB (albumina de soro bovino), variando de 0 a 25 μg .

Para a dosagem de carboidratos, as amostras de tecido vegetal foram colocadas em 5 ml de tampão fosfato 0,01 M (pH = 6,0). Em seguida, o homogenato foi centrifugado (20.000 g/25 min a 4°C) e o sobrenadante coletado com pipeta "Pasteur". A seguir, alíquotas de 0,5 ml do sobrenadante foram colocadas em tubos de ensaio contendo 1,5 ml de hidrazida do ácido *p*-hidroxibenzóico (0,5 g dissolvido em 10 ml de HCl 0,5 M, acrescido de 50 ml de NaOH 0,5 M), que após aquecimento em banho-maria (100°C) por 5 min, foi resfriado em gelo e teve sua absorbância lida a 410 nm, em espectrofotômetro (Lever, 1972). As amostras em água foram submetidas à mesma sequência.

A concentração de carboidratos totais encontrada nos discos foliares e na água foi expressa em miligrama de carboidrato/grama de peso seco de folhas de *L. alba*, utilizando a glicose como padrão.

3.9. Determinação de micro e macronutrientes em discos foliares desinfectados e não desinfectados de *L. alba*

Amostras foliares das duas formas de *L. alba* - F1 e F2 - correspondentes a 250 discos de 0,6 cm de diâmetro, obtidos através de um vazador cortante, de folhas secas e desinfectadas pelo melhor tratamento de desinfecção, obtido em 3.3.1., foram submetidas a análises de micro e macronutrientes junto ao Laboratório de Análise de Plantas do Departamento de Ciência do Solo - ESALQ/USP. As mesmas análises foram realizadas para 2 amostras de água destilada esterilizada (10 ml) que, contendo 250 discos desinfectados de cada forma de *L. alba* - F1 e F2 -, permaneceram 19 horas em contato com esses discos em um erlenmeyer nas mesmas condições de crescimento do fungo *C. gloeosporioides* (3.2). Após esse período, foram retirados os discos. Foi utilizada como prova, o mesmo volume de água esterilizada, submetido às mesmas condições.

3.10. Análise estatística

Os experimentos constantes dos itens 3.2., 3.3., 3.4., 3.5. e 3.6. foram analisados através de comparações entre médias de tratamentos, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Material vegetal, análises de solo e foliar

Os dois materiais vegetais foram identificados como *Lippia alba* (Mill) N.E. Br. por Sandra Atkins, especialista do "Royal Botanic Gardens", em Kew, Inglaterra, apesar de apresentarem diversidade morfológica e química. Como sugestão do Prof. Vinicius Castro Souza, do Departamento de Botânica da ESALQ/USP, esses materiais foram designados formas de *L. alba* - forma 1 (F1) e forma 2 (F2) -, estando registrados no ESA (herbário da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"), sob nº 20.582 - Forma 2 - e nº 20.583 - Forma 1. A forma 1 - F1 - apresenta porte mais ereto, folhas e flores com coloração mais clara e menores, permanece um maior período de tempo florida e produz maior massa vegetal quando comparada com a forma 2 - F2 - (Figura 1).

Quando do transplante a irrigação do material foi feita somente até o pegamento das mudas, pois de acordo com alguns autores (Gershenzon, 1984; Penka, 1978), a produção de óleo e outros metabólitos tende a elevar-se em

condições de estresse hídrico. Fluck (1955) ressalta também o fato de que plantas contendo óleo essencial mostram-se mais abundantes em ambientes xerofíticos do que em ambientes mesofíticos, especialmente as plantas das famílias Labiatae, Umbeliflorae, Compositae e Rutaceae.

A colheita do material vegetal foi realizada aos 4 meses, período de maior rendimento do óleo essencial, pois a senescência foliar para essa espécie já pode ser notada no 5º mês (Ming, 1992). A seguir, esse material foi pesado (galhos, flores e folhas) resultando em 73,823 kg (P.F.) para F1 e 50,234 kg para F2. Após secagem, o mesmo material resultou em 21,583 kg para F1, o que representou 70,8% em água e 13,841 kg para F2, o que representou 72,5% em água para F2. A parte utilizada - folhas -, pesou 9,387 kg para F1 e 4,568 para F2. Deu-se preferência ao material vegetal seco pela maior facilidade de trabalho e armazenamento, quando comparado com o material vegetal fresco.

Os resultados da análise do solo e das folhas das duas formas de *L. alba* estão ilustrados nas Tabelas 1 e 2, respectivamente. Não obstante os resultados da análise de solo, não foi realizada qualquer forma de adubação convencional no solo destinado ao plantio, pois o padrão nutricional dessa espécie não é conhecido e a recomendação de uma adubação química seria inviável. Ming (1994) relata que a resposta vegetal à adubação no tocante aos metabólitos secundários, é dependente de vários fatores como aspectos ambientais, rotas biossintéticas dos metabólitos e da

composição química desses metabólitos. Gershenzon (1984), citando Bradford & Hsiao⁶ (1982), Berry & Downton⁷ (1971), Chapin⁸ (1980) e Kluge⁹ (1976), relata que a deficiência nutricional de no mínimo moderada poderia ter um efeito direto na biossíntese de metabólitos secundários, devido à sua inibição a fotossíntese. Em resposta, a planta poderia: a) aumentar as atividades do metabolismo primário em detrimento do metabolismo secundário; b) aumentar as atividades do metabolismo secundário em detrimento do metabolismo primário e c) reduzir as atividades dos dois metabolismos, em vários níveis. Ming (1992), observou a presença de uma relação inversa entre os níveis de adubação orgânica e a produção de óleo essencial e metabólitos secundários para essa mesma espécie, em Colombo, PR. Parece que, por ser o óleo essencial resultante do metabolismo secundário, sua produção estaria ligada à situações limitantes (de estresse); portanto, fatores que enriquecessem esse ambiente poderiam limitar ou modificar sua produção, como é o caso da adubação. Através da análise foliar (Tabela 2), pode-se observar que os níveis de ferro

⁶ BRADFORD, K.J.; HSIAO, T.C. Physiological responses to moderate water stress. In: LANGE, O.L.; NOBEL, P.S.; OSMOND, C.B.; ZIEGLER, H., eds. **Physiological plant ecology II**. Water relations and carbon assimilation. Berlin: Springer-Verlag, 1982. p.264-324.

⁷ BERRY, J.A. & DOWNTON, D.J.S. Environmental regulation of photosynthesis. In: GOVINDJEE, ed. **Photosynthesis**, V.II, Development, Carbon Metabolism, and Plant Productivity. Academic Press, New York. p.263-343.

⁸ CHAPIN, F.S. III. The mineral nutrition of wild plants. **Ann. Rev. Ecol. Syst.**, v.11, p.233-260, 1980.

⁹ KLUGE, M. Carbon and nitrogen metabolism under water stress. In: LANGE, O.L.; KAPPEN, L.; SCHULZE, E.D., eds. **Water and plant life, problems and modern approaches**. Berlin: Springer-Verlag, 1976. p.243-252.

encontrados para as duas formas - F1 e F2 de *L. alba*, mostraram-se bastante elevados, considerando os níveis comumente encontrados em outras culturas (Malavolta et al., 1989), sendo também maior do que o valor encontrado (970 ppm) por Ming (1992), para a mesma planta, em Colombo, PR. Esses valores demonstram que *L. alba* possui uma elevada absorção desse elemento.

4.2. Germinação e formação de apressório por *C. gloeosporioides* sobre membrana de poliestireno

A Figura 2 apresenta os resultados do comportamento - germinação e formação de apressório - de conídios de *C. gloeosporioides* sobre membrana de poliestireno, durante diferentes intervalos de tempo. Pode-se verificar que tanto a germinação quanto a formação de apressórios ocorre nas 6 horas iniciais do desenvolvimento fúngico, em valores maiores do que 75%. Griffin (1994) verificou a emergência de tubos germinativos em *Neurospora tetrasperma* já nas 3 primeiras horas de ativação. Dessa forma, foi possível estipular um período adequado para a duração dos demais experimentos envolvendo a germinação e a formação de apressórios, optando-se por um período em torno de 19 horas.

4.3. Germinação e formação de apressórios por conídios de *C. gloeosporioides* em contato com discos de folhas secas de *L. alba*

O teste de desinfecção empregado, mostrou elevado nível de eficiência, pois apenas um disco de folha (F2) de duas placas distintas mostrou-se contaminado (resultado não ilustrado). Esses discos tiveram na sequência de desinfecção, lavagem em hipoclorito de sódio: água (2:1) durante 120 s ou hipoclorito de sódio : água 3:1 durante 60 s. Dessa forma, a sequência de desinfecção utilizada para os discos de folhas de *L. alba* - F1 e F2 - nos demais testes, foi: 1) água destilada (60 s); 2) álcool 70% (30 s); 3) hipoclorito de sódio : água (2:1) (60 s); 4) 4 lavagens em água destilada estéril (60 s cada).

A avaliação da porcentagem de germinação e da formação do apressório por *C. gloeosporioides*, durante diferentes tempos de contato com discos de folhas secas e desinfectadas das duas formas de *L. alba* - F1 e F2 -, foi efetuada após 19 horas do gotejamento da suspensão de esporos nas lâminas. Pelas Figuras 3 e 4, pode-se verificar que a formação de apressórios foi afetada em todos os tratamentos contendo discos de folhas, sendo drasticamente reduzida quando comparada com a testemunha, bem como o tamanho (comprimento e largura) dos tubos germinativos, que por sua vez apresentaram-se mais longos e mais largos (Figuras 5, 6 e 7). Por outro lado, a germinação ocorreu de forma homogênea,

variando somente no tratamento 2 para F1 (Figura 3) e no tratamento 1 para F2 (Figura 4), que apesar de não diferirem dos demais tratamentos, mostraram-se maiores quando comparados com a testemunha, ao nível de 5% de probabilidade.

O comprimento e a largura dos tubos germinativos foram avaliados somente nos tratamentos 1.F1/1.F2 (colocação do disco de folhas imediatamente após o gotejamento da suspensão de esporos) e 4.F1/4.F2 (colocação do disco de folhas após 120 min do gotejamento da suspensão de conídios) (Figura 5) e considerando discos de folhas das duas formas de *L. alba* - F1 e F2 - pelo fato de serem os extremos entre os tratamentos descritos, que pouco diferiram entre si. Em relação ao comprimento, os tratamentos 1.F e 4.F das duas formas de *L. alba* diferiram (ao nível de 5% de probabilidade) da testemunha (Figura 5A), superando-a. O comprimento do tubo germinativo dos conídios no tratamento 4.F1 superou os demais tratamentos, mas não diferiu do tratamento 4.F2.

Para largura, os tubos germinativos em todos os tratamentos também superaram (ao nível de 5% de probabilidade) a testemunha, sendo que o tratamento 4.F2 foi superior aos demais tratamentos.

Esses resultados indicam que as folhas secas das duas formas de *L. alba* podem conter substâncias capazes de causar alterações morfológicas no desenvolvimento de *C. gloeosporioides* no que diz respeito à formação de apressórios e ao tamanho (comprimento e largura) do tubo germinativo. Entretanto,

conforme relatado por diversos autores (Blackeman, 1971; Emmett & Parbery, 1975; Martin, 1964; Pascholati & Leite, 1995; Preece et al., 1967; Rasmussen & Went, 1965; Swinburne & Brown, 1983), o ambiente da superfície vegetal também pode influenciar a formação de apressórios. Diante disso, testes mais refinados foram realizados visando investigar esses efeitos.

4.4. Germinação e formação de apressórios por conídios de *C. gloeosporioides* em contato com extratos de *L. alba*, sobre superfície de poliestireno

Pela Figura 8, pode-se observar que com exceção do extrato etanólico na diluição (1:9), todos os demais tratamentos referentes aos extratos acetônicos, etanólicos e hexânicos de folhas de *L. alba* F1 nas três diluições, apresentaram uma porcentagem de germinação de conídios maior do que a testemunha e seus respectivos solventes puros nas mesmas diluições. O extrato etanólico na diluição (1:99) diferiu significativamente, ao nível de 5% de probabilidade, da testemunha e dos solventes. Com exceção do etanol puro na diluição (1:9), todos os demais tratamentos a partir de solventes puros tiveram uma porcentagem de germinação menor do que a testemunha. A menor porcentagem de germinação foi decorrente da acetona pura, na diluição (1:999).

Para a forma 2 de *L. alba* (Figura 9), com exceção do extrato hexânico na diluição (1:999), que nesse experimento apresentou uma porcentagem de germinação menor do que seu solvente na mesma diluição e à testemunha, os demais resultados foram semelhantes aos apresentados pelos extratos de *L. alba* F1. O extrato acetônico na diluição (1:99) apresentou uma diferença significativa, a 5% de probabilidade, mostrando-se superior aos demais tratamentos.

A formação de apressórios sobre superfície de poliestireno, observada para todos os tratamentos - diluições dos extratos acetônicos, etanólicos e hexânicos, bem como de seus solventes básicos, acetona, etanol e hexana - para as duas formas de *L. alba* - F1 e F2 - foram semelhantes (Figuras 10 e 11). Em todos os tratamentos correspondentes à diluições dos extratos, observou-se uma porcentagem de formação de apressórios menor do que testemunha, e, com exceção do tratamento extrato acetônico : água (1:999), todos os demais tratamentos referentes à diluições dos extratos, apresentaram uma taxa de formação de apressórios menor do que a de seus respectivos solventes básicos na mesma diluição, sendo que todos diferiram significativamente ao nível de 5% de probabilidade da testemunha. Os tratamentos que apresentaram a menor porcentagem de formação de apressório foram em ordem decrescente: extrato etanólico : água (1:99), extrato etanólico (1:9), extrato etanólico (1:999).

Os resultados acima confirmam os resultados ilustrados nas Figuras 3, 4, 5, 6, 7 e 8, onde a(s) substância(s) presente(s) nas folhas secas das duas formas - F1 e F2 -de *L. alba*, presentes nos três tipos de extratos causam alterações morfológicas no desenvolvimento de *C. gloeosporioides*, parecendo até estimular a germinação dos conídios, e impedindo a formação de apressórios. Essa(s) substância(s), cuja natureza não foi ainda determinada, poderia(m) ser considerada(s) como substância(s) relacionada(s) a processo(s) de defesa da planta (Benett & Walsgrove, 1994; Gershenzon, 1984; Pascholati & Leite, 1995).

4.5 Germinação e formação de apressórios por *C. gloeosporioides* em diferentes superfícies de contato

A germinação de conídios de *C. gloeosporioides* ocorreu em maior porcentagem nas superfícies dos meios de BDA e AA, em relação à superfície recoberta com poliestireno. Por outro lado, em relação à formação de apressórios, os resultados encontrados, demonstrando a ausência de apressórios nas superfícies de BDA e AA e a presença dos mesmos na superfície recoberta com poliestireno, confirmam o que muitos autores (Lunsdem & Dow, 1973; Maheshwari et al., 1967; Van Burgh, 1950; Wood, 1967) já observaram em relação à dureza e hidrofobicidade da superfície serem determinantes na formação de apressórios (Figura 12).

Durante a avaliação dos tratamentos acima, observou-se que nas superfícies de BDA e AA, o crescimento do tubo germinativo era muito maior do que nas lâminas recobertas com película de poliestireno. Para quantificar o tamanho dessas estruturas foi montado novo teste, com paralização de crescimento após 15 horas, o que configurou uma maior elongação e alargamento dos tubos germinativos nos dois meios (BDA e AA), quando comparados com a testemunha (Figura 13), sendo que os três tratamentos apresentaram diferenças significativas entre si, ao nível de 5 % de probabilidade, para as duas características - comprimento e largura. Esses resultados mostram-se contrários ao relatado por Emmett & Parbery (1975), onde espécies de *Colletotrichum* frequentemente respondem à presença de nutrientes exógenos pelo alongamento do tubo germinativo e retardamento na formação de apressórios.

4.6. Efeito dos extratos orgânicos e aquoso do tecido foliar de *L. alba* sobre o crescimento micelial *C. gloeosporioides in vitro*

As Figuras 14, 15 e 16 mostram os efeitos dos extratos de *L. alba*, nas formas 1 (F1) e 2 (F2), sobre o desenvolvimento micelial de *C. gloeosporioides in vitro*. Verificou-se que o extrato etanólico de folhas das duas formas - F1 e F2 - de *L. alba*, foi capaz de reduzir o crescimento fúngico, após 5 dias, quando comparado

com a testemunha (Figuras 14 e 15). Em ordem decrescente desse efeito, têm-se ainda extrato de hexana e o extrato de acetona para F1, que não diferiram entre si, mas diferiram do extrato etanólico; sendo que os três extratos diferiram significativamente ao nível de 5% de probabilidade da testemunha (Figura 14(A)). Para a forma 2 (F2) de *L. alba*, em ordem decrescente de efeito têm-se o extrato de etanol, o extrato de acetona e o extrato de hexana, todos diferindo significativamente entre si e da testemunha (Figura 14(B)).

Em relação aos controles, representados pelos solventes puros (sozinhos), todos diferiram significativamente da testemunha, ao nível de 5% de probabilidade, causando uma redução do crescimento micelial de *C. gloeosporioides*; entretanto, todos os demais extratos ocasionaram um crescimento fúngico significativamente menor do que seus respectivos solventes (Figuras 14 e 15).

Os extratos aquosos, obtidos a partir do tecido foliar das formas 1 e 2 de *L. alba*, não alteraram o crescimento vegetativo de *C. gloeosporioides*, pois não foram observadas diferenças significativas no crescimento fúngico entre os tratamentos e a testemunha (Figura 16).

4.7. Bioensaio para frações fungitóxicas presentes nos extratos de folha de *L. alba*

A possível existência de compostos inibidores do desenvolvimento de *C. gloeosporioides* nos extratos das duas formas de *L. alba*, (Tabela 3) pode ser demonstrada pela formação de zonas de inibição nos extratos: a) Forma 1: aquoso, aquoso (1:10); acetônico, etanólico, etanólico (1:10), hexânico, hexânico (1:10); Forma 2: aquoso, acetônico, acetônico (1:10), etanólico, etanólico (1:10) e hexânico. Esses resultados vêm mais uma vez comprovar o efeito inibitório de *L. alba*, já apresentado nos experimentos até agora discutidos. No entanto, nesse experimento verificou-se a ação inibitória dos extratos aquosos para as duas formas de *L. alba*, resultado até então não obtido. Pode-se ressaltar ainda que essas substâncias ou parte delas são solúveis em todos os solventes empregados.

4.8. Determinação de micro e macronutrientes, carboidratos e proteínas em folhas de *L. alba*

Os níveis de micro e macronutrientes encontrados em folhas desinfetadas das duas formas - F1 e F2 - de *L. alba*, assim como na água resultante da lixiviação dessas folhas, são apresentados na Tabela 2. Observando esses valores

e comparando-os com os teores de micro e macronutrientes encontrados em folhas de *L. alba*, nas suas duas formas - F1 e F2 -, verificou-se, que pelo tratamento de desinfecção, ocorreu uma redução em todos os nutrientes; quando se observou a água resultante da lixiviação, a redução foi maior ainda.

Quando comparados (Malavolta et al., 1989) com os teores foliares de macro e micronutrientes considerados adequados para a cultura de citros, verificou-se que os valores encontrados, para esses nutrientes nas folhas de *L. alba*, ou nas folhas já desinfectadas encontram-se praticamente na mesma faixa, eliminando a hipótese de que certos íons possam estar influenciando a não formação de apressórios (Emmett & Parbery, 1975).

Da mesma forma, pela Tabela 4, pode-se verificar que o conteúdo de proteínas e carboidratos totais encontrados na água decorrente da lixiviação das folhas desinfectadas de *L. alba* nas suas duas formas, mostram-se reduzidos em relação ao conteúdo encontrados nas folhas.

Como já foi verificado em 4.3.1., a formação de apressórios nos diversos extratos de *L. alba* - F1 e F2 - ocorreu de forma desigual entre os vários tratamentos. Nesse caso, não houve a desinfecção dos tecidos previamente à produção dos extratos; portanto, pode-se atribuir tais comportamentos à substância(s) existente(s) nas folhas secas das duas formas de *L. alba*.

4.9. Efeito fungitóxico x efeito nutricional

Os resultados obtidos nesse trabalho demonstraram a existência de substâncias inibidoras do desenvolvimento e da formação de apressórios por *C. gloeosporioides*, nos tecidos foliares das duas formas de *L. alba* - F1 e F2 -, solúveis em diferentes solventes (água, acetona, etanol e hexana), com uma maior solubilidade em etanol, indicando a possibilidade de controle desse fungo.

Os efeitos nutricionais (Dunkle, 1970; Emmett & Parbery, 1975; Mercer et al, 1971), do tecido foliar das duas formas de *L. alba* que poderiam estar envolvidos nesses resultados, mostram-se não efetivos através dos resultados obtidos: formação de apressórios em suspensão de conídios à 0,5% de glicose sobre superfície de poliestireno; aumento do tamanho (comprimento e largura) dos tubos germinativos de suspensão de conídios em lâminas recobertas com meio de BDA e AA; e também pelos níveis de micro, macronutrientes e conteúdos de proteínas e carboidratos encontrados em folhas secas de *L. alba*.

O controle de *C. gloeosporioides* tem sido feito principalmente através da proteção das inflorescências mediante pulverizações com fungicidas sistêmicos como benomyl (Feichtenberger, 1991; Prates, 1991; Whiteside et al., 1989), sendo que Goes (1995) em experimentos realizados em condições de campo, verificou que outros fungicidas igualmente pertencentes ao grupo dos benzimidazóis como

carbendazim e tiofanato metílico, e também prochloraz e tebuconazole mostraram-se eficientes. Esses produtos inibem, seletivamente, processos metabólicos específicos (Kimati, 1995).

Em vista do exposto, *L. alba* exibe um efeito potencial no controle de *C. gloeosporioides*, pois inibe a formação de apressórios, estrutura essencial para a patogenicidade desse fungo. Estudos sobre o uso de inibidores da penetração têm recebido atenção especial nos últimos anos; essas substâncias são conhecidas também como antipenetrantes (Sisler, 1986), e atuam inibindo a formação de apressórios e, conseqüentemente, a penetração.

Kishore et al (1983), Kishore & Mishra (1991) e Dwivedi et al (1990), em diferentes estudos comprovaram o efeito fungitóxico do óleo essencial de *L. alba* para vários fungos fitopatogênicos, inclusive *C. gloeosporioides*.

CONCLUSÃO

A inibição da formação de apressórios por conídios de *C. gloeosporioides*, *in vitro*, em função de tratamentos com material vegetal ou extratos obtidos de *L. alba*, em condições de laboratório, indicam a existência de substâncias com efeito tóxico ao fungo, levantando a hipótese da possibilidade do emprego de preparações com *L. alba* no controle da infecção de plantas cítricas pelo fungo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, P.B.; SPROSTOM, T.; TIETZ, H., MAJOR, R.T. Studies on the disease resistance of *Ginkgo biloba*. **Phytopatology**, v.52, n.2, p.233-6, 1962.
- ALBUQUERQUE, J. N. de. **Plantas medicinais de uso popular**. Brasília: ABEAS/MEC, 1989. 96p.
- ALICE, D.; RAO, A.V. Antifungal-effects of plant extracts on *Drechslera oryzae* in rice. **International Rice Research Newsletter**, v.12, n.2, p.28, 1987.
- AMORIM, L. Infecção. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L., ed. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v.1, p.295-308.
- ANDRADE, J.M.T. **Saber e poder das plantas**. s.n.t. p.77-81: Monografia sobre cidreira.
- ANGELUCCI, M.E.M.; CORDAZZO, S.N.; FORTES, V.A. Efeitos farmacológicos do extrato aquoso de *Lippia alba* N.E.B. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 6., João Pessoa, 1990. **Resumos**. João Pessoa: UFP, 1990, p.4-12.

- BAILEY, J.A.; O'CONNELL, R.J.; PRING, R.J.; NASH, C. Infection strategies of *Colletotrichum* species. In: BAILER, J.A.; JEGER, M.J., ed. ***Colletotrichum: biology, pathology and control***. Wallingford: CAB International, 1992. p.68-88.
- BAKER, K. Envolving concepts of biological control of plant pathogen. **Annual Review of Phytopathology**, v.25, p.67-85, 1987.
- BALANDRIN, M.F.; KLOCKE, J.A. Medicinal, aromatic and industrial materials from plants. In: BAJAJ, Y.P.S., ed. **Biotechnology in agriculture and forestry**. Berlin: Springer Verlag, 1988. v.4, p.3-36.
- BENNETT, R.N.; WALLSGROVE, R.M. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. **New Phytologist**, v.127, n.4, p.617-33, 1994.
- BEZERRA, P.; FERNANDES, A.G.; CRAVEIRO, A.A.; ANDRADE, C.H.S.; MATOS, F.J.A.; ALENCAR, J.W.; MACHADO, M.I.L.; VIANA, G.S.B.; FÁTIMA MATOS, F.; RELIA ROUQUAYROL, M. Composição química e atividade biológica de óleos essenciais de plantas do nordeste-Gênero *Lippia*. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 6., Fortaleza, 1980. Resumos. **Ciência e Cultura**, v.33, p.1-14, 1981. Suplemento, 1.
- BLACKEMAN, J.P. The chemical environment of the leaf surface in relation to growth of pathogenic fungi. In: PREECE, T.F.; DICKINSON, C.H., ed. **Ecology of leaf surface micro-organism**. London: Academic Press, 1971. p.246-55.
- BOWERS, W.S.; NISHIDA, R. Juvocimenes: potent juvenile hormone mimics from sweet basil. **Science**, v.209, n.29, p.1030-2, 1980.

- BOYLE, C. Studies in the physiology of parasitism. **Annual Botany**, v.35, p.337-47, 1921.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method fot the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-54, 1976.
- BRAGA, R. **Plantas do Nordeste, especialmente as do Ceará**. 3.ed. Mossoró: Escola Superior de Agricultura de Mossoró, 1976. 540p. (Coleção Mossoroense, 62).
- BURDEN, R.S.; KEMP, M.S. Sesquiterpene phytoalexins from *Ulmus glabra*. **Phytochemistry**, v. 23, n.2, p.383-5, 1984.
- CECY, C. **Farmacognosia**. Curitiba: Fundação Caetano Munhoz da Rocha, 1989. 52p.
- COOK, R.J.; BAKER, K.J. **The nature and practice of biological control of plant pathogens**. St. Paul: ABS Press, 1983. cap.3, p.57-83: Components of biological control.
- CORREA, C.B.V. Contribuição ao estudo de *Lippia alba* (Mill) N.E. Br. ex Britt & Wilson - erva cidreira. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.73, n.3, p.57-64, 1992.
- CORREA, M.P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil**. Rio de Janeiro: IBDF, 1984. v.4, p.40: herva cidreira do campo.

- CORREA JR., C.; MING, L.C.; SCHEFFER, M. **Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas.** 2.ed. Jaboticabal: FUNEP, 1994. 151p.
- COSTA, A.F. **Farmacognosia.** Lisboa: Ed. Fundação Caloust Gulbenkian, 1986. v.1, 853p.
- CRAVEIRO, A.A.; ALENCAR, J.W.; MATOS, F.J. de A.; ANDRADE, C.H.S.; MACHADO, M.I.L. Essential oils from Brazilian Verbenaceae Genus *Lippia*. **Journal of Natural Products**, v.44, n.5, p.598-601, Sept./Oct. 1981a.
- CRAVEIRO, A.A.; FERNANDES, A.G.; ANDRADE, C.H.S.; MATOS, F.J. de A.; ALENCAR, J.W. de.; MACHADO, M.I.L. **Óleos essenciais de plantas do Nordeste.** Fortaleza: Ed. UFC, 1981b. 210p.
- DAAYF, F.; SCHIMITT, A.; BÉLANGER, R.R. The effects of plant extracts of *Reynoutria sachalinensis* on powdery mildew development and leaf physiology of long english cucumber. **Plant Disease**, v.79, n.6, p.577-80, June 1995.
- DI MENNA, M.E. The mycoflora of leaves of pasture plants in New Zeland. In: PREECE, T.F.; DICKINSON, C.H., ed. **Ecology of leaf surface micro-organisms.** London: Academic Press, 1971. p.140-59.
- DINIZ, S.P.S.S.; LEITE, C.A.; LOZANO, V.F.; REZENDE, D.C.; TONÁ, N.; SOUZA, L.A.S.; VIDA, J.B. Efeitos do bálsamo de copaíba sobre o crescimento de *Fusarium moniliforme*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 28., Ilhéus, 1995. Resumos. **Fitopatologia Brasileira**, v.20, p.340, ago. 1995. Suplemento.

- DI STASI, L.C.; SANTOS, E.M.G.; SANTOS, C.M. dos; HIRUMA, C.A. **Plantas medicinais na Amazônia**. São Paulo: UNESP, 1989. p.65-66.
- DUBEY, N.K.; KISHORE, N. Fungitoxicity of some higher plants and synergistic activity of their essential oils. **Tropical Science**, v.27, n.1, p.23-7, 1987.
- DUKE, M.M. The genera *Vermicularia* and *Colletotrichum*. **Transactions of British Mycology Society**, v.13, p.156-84, 1928.
- DUNKLE, L.D.; WERGIN, W.P.; ALLEN, P.J. Nucleoli in differentiated germ tubes of wheat stem rust uredospores. **Canadian Journal of Botany**, v.48, n.9, p.163-5, 1970.
- DWIVEDI, S.K.; KISHORE, N.; DWIVEDI, S.K. Fungitoxicity of some essential oils against *Macrophomina phaseolina*. **Indian Perfumer**, v.34, n.1, p.20-1, 1990.
- ELANOVICK, S.D. The essential oil of *Lippia adoensis* leaves and flowers. **Journal of Natural Products**, v.50, n.3, p.503-6, 1987.
- EMMETT, R.W.; PARBERY, D.G. Apressoria. **Annual Review of Phytopathology**, v.13, p.147-67, 1975.
- FAGAN, H.J. Postbloom fruit drop of citrus in Belize. I. Disease epidemiology. **Turrialba**, v.34, n.2, p.173-7, 1984.
- FAWCETT, C.H.; SPENCER, D.M. Plant chemotherapy with natural products. **Annual Review of Phytopathology**, v.18, p.403-18, 1970.

- FEICHTENBERGER, E. Queda de frutos jovens de citros, doença induzida por uma raça virulenta do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*. **Laranja**, v.12, n.2, p.513-21, 1991.
- FLUCK, H. The influence of climate on the active principles in medicinal plants. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, p.361-83, 1955.
- GERSHENZON, J. Changes in the levels of plant secondary metabolites under water and nutrient stress. In: TIMMERMAN, B.N.; STEELING, C., ed. **Phytochemical adaptations to stress**. New York: Plenum Press, 1984. cap. 10, p.273-320. (Recent Advances in Phytochemistry, 18).
- GIESBRECHT, A.M. Atividade antibiótica de produtos naturais. São Paulo, 1980. 64p. Tese (Livre-docência) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.
- GOES, A. de. Queda prematura dos frutos cítricos: caracterização do agente causal, *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. [Sensu Arx, 1957], e controle da doença; Piracicaba, 1995. 143p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- GOMES, E.C. Ensaio preliminares e marcha sistemática fitoquímica para *Lippia alba* (Mill) N.E.Br. Verbenaceae. Curitiba: UFPR, 1990. 6p.
- GOTTLIEB, O.R.; SALATINO, A. Função e evolução de óleos essenciais e de suas estruturas secretoras. **Ciência e Cultura**, v.39, n.8, p.707-16, ago. 1987.

- GRIFFIN, D.H. **Fungal physiology**. New York: Wiley-Liss, 1994. p.375-38: Spore dormancy and germination.
- HARPER, D.B.; SWINBURNE, T.R.; MOORE, S.K.; BROWN, A.E.; GRAHAM, H. A role for iron in germination of conidia of *Colletotrichum musae*. **Journal of General Microbiology**, v.121, n.1, p.169-74, 1980.
- HEAGLE, A.S. Interaction between air pollutants and plant parasites. **Annual Review of Plant Pathology**, v.11, p.365-88, 1973.
- HOWE, H.F.; WESTLEY, L.C. **Ecological relationship of plants and animals**. New York: Oxford University Press, 1988. p.29-87.
- KERR, A.; FLENTJE, N.T. Host infection in *Pellicularia filamentosa* controlled by chemical stimuli. **Nature**, v.179, n.4552, p.204-5, 1957.
- KIMATI, H. Controle químico. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L., ed. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Agronômicas Ceres, 1995. v.1, p.761-85.
- KISHORE, N.; MISHRA, A.K. Effect of essential oils on sclerotial germination of *Rhizoctonia solani*. **National Academy Science Letters**, v.14, p.239-40, 1991.
- KISHORE, N.; DUBEY, N.K.; SRIVASTA, O.P.; SINGH, S.K. Volatile fungitoxicity in some higher plants as evaluated against *Rhizoctonia solani* and some other fungi. **Indian Phytopathology**, v.36, n.4, p.724-6, 1983.

- LARANJEIRA, D.; NEVES, R.P.; OLIVEIRA, S.M.A. Efeito do extrato de juazeiro (*Zizyphus joazeiro*) no crescimento de *Pseudomonas solanacearum*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 28., Ilhéus, 1995. Resumos. **Fitopatologia Brasileira**, v.20, p.287, ago.1995a. Suplemento.
- LARANJEIRA, D.; NEVES, R.P.; OLIVEIRA, S.M.A. Efeito de extratos de juazeiro (*Zizyphus joazeiro*) e sisal (*Agave sisalana*) sobre *Botryodiplodia teobromae*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 28., Ilhéus, 1995. Resumos. **Fitopatologia Brasileira**, v.20, p.321, ago. 1995b. Suplemento.
- LEITE, B. Production of mycosporine-alanine, acetic acid and uridine by cultures of *Colletotrichum graminicola*: their role in conidial maturation and development. West Lafayette, 1992. 89p. Thesis (PhD) - Purdue University.
- LEITE, B.; NICHOLSON, R.L. Mycosporine-alanine: a self-inhibitor of germination from the conidial mucilage of *Colletotrichum graminicola*. **Experimental Mycology**, v.16, n.1, p.76-86, 1992.
- LEMONS, T.L.G.; MATOS, F.J.A.; ALENCAR, J.W.; CRAVEIRO, A.A.; CLARK, A.M.; Mc CHESNEY, J.D. Antimicrobial activity of essential oils of brazilian plants. **Phytotherapy Research**, v.4, n.2, p.82-4, 1990.
- LEVER, M. A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. **Analytical Biochemistry**, v.47, p.273-9, 1972.

- LOPEZ, A.M.Q. Controle alternativo da antracnose por *Colletotrichum graminicola* (Ces.) Wils em sorgo (*Sorghum bicolor* L. (Moench)). Rio Claro, 1991. 203p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual de São Paulo.
- LOPEZ, A.M.Q.; PASCHOLATI, S.F. Accumulation of a complex of pigments in *Sorghum* mesocotyls in response to wounding. **Journal of Phytopathology**, v.135, p.63-70, 1992.
- LUMSDEN, R.D.; DOW, R.L. Histopathology of *Sclerotinia sclerotiorum* infection of bean. **Phytopathology**, v.63, n.6, p.708-15, 1973.
- MAHESHWARI, R.; ALLEN, P.J.; HILDEBRANDT, A.C. Physical and chemical factors controlling the development of infection structures from urediospore germ tubes of rust fungi. **Phytopathology**, v.57, p.855-62, 1957.
- MAIA, J.G.S.; SILVA, M.H.L. da; ZOGHIBI, M.G.B.; ANDRADE, E.H.A. Óleos essenciais da Amazônia com perspectivas em aromaterapia. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 13., Fortaleza, 1994. **Resumos**. Fortaleza: UFC, 1994. n.p.
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. de. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fósforo, 1989, 201p.
- MARTIN, J.T. Role of cuticle in the defense against plant disease. **Annual Review of Phytopathology**, v.2, p.81-100, 1964.

- MARTINS, E.M.F.; ROVERATTI, D.S.; MORAES, W.B.C. Elicitation of stress metabolites in coffee leaves by a non-pathogen. **Fitopatologia Brasileira**, v.11, n.4, p.683-95, 1986.
- MERCER, P.C.; WOOD, R.K.S.; GREENWOOD, A.D. Initial infection of *Phaseolus vulgaris* by *Colletotrichum lindemuthianum*. In: PREECE, T.F.; DICKINSON, C.H., ed. **Ecology of leaf surface micro-organisms**. London: Academic Press, 1971. p.381-9.
- MIACHIR, J.I. Proposição de um protocolo de cultura de tecidos para produção de compostos secundários para *Curcuma zedoaria* Roscoe. Piracicaba, 1992. 126p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- MING, L.C. Influência de diferentes níveis de adubação orgânica na produção de biomassa e teor de óleos essenciais de *Lippia alba* (Mill) N.E. Br. Verbenaceae. Curitiba, 1992. 206p. Dissertação (Mestrado) em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- MING, L.C. Estudo e pesquisa de plantas medicinais na agronomia. **Horticultura Brasileira**, v.12, n.1, p.3-9, 1994.
- MISHRA, A.K.; DUBEY, N.K. Fungitoxicity of essential oil of *Amomum sublatum* against *Aspergillus flavus*. **Economic Botany**, v.44, n.4, p.530-3, 1990.
- MOLDENKE, H.N. Materials toward a monograph of the genus *Lippia*. I. **Phytologia**, v.12, n.1, p.6-71, 1961.

- NISHIMURA, H.; NAKAMURA, T.; MIZUTANI, J. Allelopathic effects of *p*-menthane-3-8-diols in *Eucalyptus citriodora*. **Phytochemistry**, v.23, n.12, p.2777-9, 1984.
- OLIVEIRA, S.M.A.; MENEZES, M. Efeito de extrato de caroá (*Neoglaziovia variegata*) e sisal (*Agave sisalana*) sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 28., Ilhéus, 1995. Resumos. **Fitopatologia Brasileira**, v.20, p.289, ago. 1995. Suplemento.
- PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Mecanismos bioquímicos de resistência às doenças. In: LUZ, W.C., ed. et al. **Revisão anual de patologia de plantas**. Passo Fundo: RAPP, 1994. v.2, p.1-53, 1994.
- PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L., ed. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v.1, p.417-53.
- PENKA, M. Effects of irrigation on the content of essential oil in officinal plants. **Acta Horticulturae**, v.73, p.181-98, 1978.
- PORTO, O. de M. Comparação de programas de controle químico da queda anormal de frutos jovens de citrus. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 6., Recife, 1981. **Anais**. Recife: S.B.F., 1981. v.2, p.481-90.
- PRATES, H.S. Ocorrência e controle da doença fúngica "queda anormal de frutos jovens de citros" causada por *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. **Laranja**, v.12, n.2, p.523-38, 1991.

- PREECE, T.F.; BARNES, G.; BAILEY, J.M. Junctions between epidermal cells as sites of apressorium formation by plant pathogenic fungi. **Plant Pathology**, v.16, p.116-8, 1967.
- RASMUSSEN, R.A.; WENT, F.W. Volatile organic materials of plant origin in the atmosphere. **Proceedings of the National Academy of Science**, v.53, p.215-20, 1965.
- RODRIGUES, F.A.; MACHADO, C.F.; ARAÚJO, G.M.; JULIATTI, F.C.; BORGES, A.C.F.; PEIXOTO, J.R. Efeito de dois extratos aquosos na germinação, crescimento e produção de escleródios de *Sclerotium rolfsii* in vitro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 28., Ilhéus, 1995. Resumos. **Fitopatologia Brasileira**, v.20, p.287, ago. 1995. Suplemento.
- SBRAGIA, R.J. Chemical control of plant disease - an exciting future. **Annual Review of Phytopathology**, v.13, p.257-67, 1975.
- SCHEFFER, M.C. **Recomendações técnicas para o cultivo das plantas medicinais selecionadas pelo Projeto de Fitoterapia do SUDS/Paraná**. Curitiba: Secretaria de Estado da Saúde/Fundação Caetano Munhoz da Rocha, 1989. p.12-3.
- SHARMA, J.K.; SINHA, S. Effect of leaf exsudates of *Sorghum* varieties varying in susceptibility and maturity on the germination of conidia of *Colletotrichum graminicola* (Ces.) Wilson. In: PREECE, T.F.; DICKINSON, C.H., ed. **Ecology of leaf surface micro-organisms**. London: Academic Press, 1971. p.582-96.

- SHARP, E.L.; SMITH, F.G. Factors affecting germ tube development in *Puccinia coronata avenae*. In: ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN PHYTOPATHOLOGICAL SOCIETY, 45., Madison, 1953. Abstracts. **Phytopathology**, v.43, n.9, p.483, Sept. 1953.
- SHETHNA, Y.I.; RAO, B.M. Reduction in pathogenic and saprophytic fungi in maize, chilli and paddy seeds by hydrochloric acid vapours and soaking in HCl solution treatment. **Current Science**, v.50, n.3, p.155, 1981.
- SINHA, S. The microflora on leaves of *Capsicum annum* (L.) Watt E.D., *Solanum melongena*, *Solanum tuberosum* L., and *Lycopersicum esculentum* Mill. In: PREECE, T.F.; DICKINSON, C.H., ed. **Ecology of leaf surface micro-organisms**. London: Academic Press, 1971. p.160-75.
- SISLER, H.D. Control of fungal diseases by compounds acting as antipenetrants. **Crop Protection**, v.5, p.306-13, 1986.
- SKINNER, F.A. Antibiotics. In: PAECH, K.; TRACEY, M.V., ed. **Modern methods of plant analysis**. Berlin: Springer-Verlag, 1955. v.3, p.626-725.
- SKOROPAD, W.P. Effect of temperature on the ability of *Colletotrichum graminicola* to form appressoria and penetrate barley leaves. **Canadian Journal of Plant Science**, v.47, n.4, p.431-4, 1967.
- SUTTON, B.C. The genus *Glomerella* and its Anamorph *Colletotrichum*. In: BAILER, J.A.; JEGER, M.J. ***Colletotrichum*: biology, pathology and control**. Wallingford: CAB International, 1992. p.1-26.

- SWINBURNE, T.R.; BROWN, A.E. Appressoria development and quiescent infections of banana fruit by *Colletotrichum musae*. **Transactions of the British Mycological Society**, v.80, p.176-8, 1983.
- THOMPSON, D.P. Effect of essential oils on spore germination of *Rhizopus*, *Mucor* and *Aspergillus* species. **Mycologia**, v. 78, n.3, p.482-5, 1986.
- TUITE, J. **Plant pathological methods**: fungi and bacteria. Minneapolis: Burgess Publ., 1969. 239p.
- VALARINI, P.J.; FRIGUETTO, P.T.S.; SPADOTTO, C.A. Potencial da erva medicinal (*Cymbopogon citratus*) no controle de fitopatógenos do feijoeiro e plantas daninhas em áreas irrigadas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 28., Ilhéus, 1995. Resumos. **Fitopatologia Brasileira**, v.20, p.323, ago. 1995. Suplemento.
- VAN BURGH, P. Some factors affecting appressorium formation and penetrability of *Colletotrichum phomoides*. In: ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN PHYTOPATOLOGICAL SOCIETY, 41., New York, 1949. Abstracts. **Phytopathology**, v.40, n.1, p.29, Jan. 1950.
- VESQUE, M.J. Caracteres des principales familles Gramopetales tirés de la anatomie de la feuille. **Annales des Sciences Naturelles**. Sér-7, v.1, p.183-360, 1885.
- VIEIRA, L.S. **Fitoterapia da Amazônia**: manual de plantas medicinais (a Farmácia de Deus). 2.ed. São Paulo: Ed. Ceres, 1992. 347p.

- WAGNER, L.J.; FLORES, H.E. Effect of Taxol and related compounds on growth of plant pathogenic fungi. **Phytopathology**, v.84, n.10, p.1173-8, 1994.
- WHITESIDE, J.O.; GARNSEY, S.M.; TIMMER, L.W., ed. **Compendium of citrus diseases**. Saint Paul: APS Press, 1989. 80p.
- WILLIAMS, P.G. A new perspective of the axenic culture of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* from uredospores. **Phytopathology**, v.61, n.8, p.994-1002, 1971.
- WOOD, R.K.S. **Physiological plant pathology**. Oxford: Blackwell, 1967. 570p.
- YARWOOD, C.E. Powdery mildews. **Botanical Review**, v.23, n.4, p.235-301, 1957.

APÊNDICE

Tabela 1 - Resultados da análise de solo, a partir de amostras de solo à 0,0 - 0,20 m e 0,20 - 0,40 m de profundidade.

Profundidade	P(resina)	pH	M.O.	S-SO ₄	K	Ca	Mg	Al	H+Al	SB	T	V	B	Cu	Fe	Mn	Zn
(m)	(μg/cm ³)	CaCl ₂	%	meq/100 cm ³								%	(ppm)				
AM 0-0,20	8	5,5	2,4	14,33	0,55	6,7	2,8	0,0	2,5	10,1	12,6	80	0,38	0,60	22	28,00	1,7
AM 00-0,40	8	5,0	2,1	12,99	0,56	7,2	2,1	0,0	3,4	9,9	13,3	74	0,38	0,64	25	38,80	1,4

M.O. -matéria orgânica

S.B. -soma de bases (K + Ca + Mg)

T - soma de bases + H + Al

V - saturação por bases $[(S.B. / T) \cdot 100]$

Tabela 2 - Teores de macro e micronutrientes em folhas secas de *Lippia alba* desinfectadas ou não.

CONCENTRAÇÃO DE MACRONUTRIENTES E MICRONUTRIENTES **											
Amostras *	N	P	K	Ca	Mg	S	B	Cu	Fe	Mn	Zn
	g/kg						mg/kg				
<u>Sem</u> <u>desinfecção</u>											
F1	37,1	3,9	15,9	33,9	4,8	4,7	106	12	1889	105	78
F2	37,8	3,2	14,7	33,3	3,2	4,0	87	10	2363	110	48
<u>Com</u> <u>desinfecção</u>											
F1	-	2,6	1,1	22,1	2,4	1,6	-	9,0	504,0	45,0	42,0
F2	-	1,5	2,0	15,9	1,7	1,6	-	7,0	341,0	41,0	25,0
A.F1	-	-	1,0	2,3	1,8	-	-	0,6	----	-	2,4
A.F2	-	-	1,6	2,0	1,7	-	-	0,6	----	-	2,4
Controle	-	-	-	-	-	-	-	-	----	-	-

* F1 = *L. alba* - forma 1; F2 = *L. alba* - forma 2; A.F1 = água resultante da lixiviação do tecido foliar de *L. alba* - forma 1; A.F2 - água resultante da lixiviação do tecido foliar de *L. alba* forma 2; Controle - água destilada estéril (prova).

** - = elemento não analisado ou valor "zero" no resultado.

---- = traços do elemento.

Tabela 3 - Bioensaio usando cromatografia de camada delgada para a detecção de frações fungitóxicas presentes nos extratos foliares de *Lippia alba* forma 1 ou forma 2.***

Amostra**	Zonas de inibição*	Aspecto	
		Luz Visível	U.V. Curto
Forma 1			
O	0,86	verde	vermelho
Oi	0,94	verde	vermelho
A	0,95	verde	vermelho
Ai	-	-	-
E	0,72	verde	vermelho
Ei	0,95	verde	vermelho
H	0,80	verde	vermelho
	0,96	verde	vermelho
Hi	0,91	verde	vermelho
Forma 2			
O	0,92	verde	vermelho
Oi	-	-	-
A	0,86	verde	vermelho
Ai	0,92	verde	vermelho
E	0,84	verde	vermelho
Ei	0,92	verde	vermelho
H	0,78	verde	vermelho
Hi	-	-	-

* Número refere-se a distância do centro da zona de inibição dividida pela distância de corrida do solvente.

** O - extrato aquoso; Oi - extrato aquoso 1:10 (óleo:água); A - extrato acetônico; Ai = extrato acetônico 1:10 (extrato:solvente); E - extrato etanólico; Ei = extrato etanólico 1:10 (extrato:solvente); H - extrato hexânico; Hi = extrato hexânico 1:10 (extrato:solvente).

*** Após 9 horas de corrida, as placas foram mantidas sob condições de laboratório para a evaporação dos solventes. Doze horas mais tarde, as placas foram aspergidas com suspensão de conídios de *Colletotrichum gloeosporioides* e as zonas de inibição observadas 48 horas mais tarde.

Tabela 4 - Conteúdo de proteínas e carboidratos totais em folhas secas de *Lippia alba* (F1) e (F2) e na água de lixiviação das folhas.

Amostras*	Proteínas	Carboidratos
	(mg/gps)	(mg/gps)
F1	6,07	0,18
A.F1	0,61	0,06
F2	8,89	0,09
A.F2	0,57	0,06

* F1 = *L. alba* - forma 1; F2 = *L. alba* - forma 2; A.F1 = água resultante da lixiviação de *L. alba* - forma 1; A.F2 = água resultante da lixiviação de *L. alba* - forma 2

Figura 1 - Aspecto de *Lippia alba* - formas F1 (A) e F2 (B) - em condições de campo e, (C) - detalhe do ramo e folhas aos 3 meses.

Figura 2 - Germinação de conídios e formação de apressórios por *Colletotrichum gloeosporioides*, sobre superfície de poliestireno. T.G. - tubo germinativo; AP - apressório. As barras representam o desvio padrão da média.

Figura 3 - Efeito de discos de folhas de *Lippia alba* - F1 - na germinação de conídios e formação de apressórios por *C. gloeosporioides*, após diferentes tempos de contato dos discos com a suspensão de esporos. Tratamentos: 1- contato imediatamente após gotejamento da suspensão de esporos; 2- contato após 30 min do gotejamento da suspensão de esporos; 3- contato após 60 min do gotejamento da suspensão de esporos; 4- contato após 120 min do gotejamento da suspensão de esporos; 5- testemunha (água destilada e esterilizada). As barras representam o desvio padrão da média. T.G. - tubo germinativo; AP - apressório.

Figura 4 - Efeito de discos de folhas de *Lippia alba* - F2 - na germinação de conídios e formação de apressórios por *C. gloeosporioides*, após diferentes tempos de contato dos discos com a suspensão de esporos. Tratamentos: 1- contato imediatamente após gotejamento da suspensão de esporos; 2- contato após 30 min do gotejamento da suspensão de esporos; 3- contato após 60 min do gotejamento da suspensão de esporos; 4- contato após 120 min do gotejamento da suspensão de esporos; 5- testemunha (água destilada e esterilizada). As barras representam o desvio padrão da média. T.G. - tubo germinativo; AP - apressório.

Figura 5 - Efeito de discos de folhas de *Lippia alba* - F1 e F2 - no comprimento (A) e na largura (B) de tubos germinativos de conídios de *C. gloeosporioides*, após diferentes tempos de contato com a suspensão de esporos. Tratamentos: 1. F1 - contato dos discos de folhas da forma 1 com a suspensão de esporos, imediatamente após o gotejamento; 1. F2 - contato dos discos de folhas da forma 2 com a suspensão de esporos, imediatamente após o gotejamento; 4. F1 - contato dos discos de folhas da forma 1, após 120 min do gotejamento; 4. F2 - contato dos discos de folhas da forma 2, após 120 min do gotejamento. T - testemunha (suspensão de esporos sem disco foliar). As barras representam o desvio padrão da média.

Figura 6 - Influência de discos de folhas de *Lippia alba* - F1 e F2 - na germinação e formação de apressórios por conídios de *C. gloeosporioides*, sobre superfície de poliestireno. A - testemunha (suspensão de esporos sem disco foliar); B - discos de folhas de F1 colocados em contato com os conídios 120 min após o gotejamento; C - discos de folhas de F2 colocados em contato com os conídios 120 min após o gotejamento; c - conídio; tg - tubo germinativo; ap - apressório. Aumento de 400 x; barras = 10,7 μm .

Figura 7 - Microscopia eletrônica de varredura ilustrando a influência de discos de folhas de *Lippia alba* - F1 e F2 - na germinação e formação de apressórios por conídios de *C. gloeosporioides*, sobre superfície de poliestireno. A - testemunha (suspensão de esporos sem disco foliar). Barra = 4 μm ; B - discos de folhas de *Lippia alba* - F1 - na germinação e formação de apressórios por conídios de *C. gloeosporioides*, sobre superfície de poliestireno. Barra = 10 μm . C - discos de folhas de *Lippia alba* - F2 - na germinação e formação de apressórios por conídios de *C. gloeosporioides*, sobre superfície de poliestireno. Barra = 10 μm . c - conídio; tg - tubo germinativo; ap - apressório.

Figura 8 - Efeito de extratos de *Lippia alba* (F1) obtidos com acetona, etanol ou hexana na germinação de conídios de *Colletotrichum gloeosporioides*, sobre superfície de poliestireno. Tratamentos: diluições (extrato : água ou solvente : água; v/v) - 1 (1:9); 2 (1:99); 3 (1:999) -. E - extrato; S - solvente puro; T - água destilada esterilizada. Avaliações efetuadas 19 horas após o início dos experimentos. Barras representam o desvio padrão da média.

Figura 9 - Efeito de extratos de *Lippia alba* (F2) obtidos com acetona, etanol ou hexana na germinação de conídios de *Colletotrichum gloeosporioides*, sobre superfície de poliestireno. Tratamentos: diluições (extrato : água ou solvente : água; v/v) - 1 (1:9); 2 (1:99); 3 (1:999) -. E - extrato; S - solvente puro; T - água destilada esterilizada. Avaliações efetuadas 19 horas após o início dos experimentos. Barras representam o desvio padrão da média.

Figura 10 - Efeito de extratos de *Lippia alba* (F1) obtidos com acetona, etanol ou hexana na formação de apressórios por *Colletotrichum gloeosporioides*, sobre superfície de poliestireno. Tratamentos: diluições (extrato : água ou solvente : água; v/v) - 1 (1:9); 2 (1:99); 3 (1:999) -. E - extrato; S - solvente puro; T - água destilada esterilizada. Avaliações efetuadas 19 horas após o início dos experimentos. Barras representam o desvio padrão da média.

Figura 11 - Efeito de extratos de *Lippia alba* (F2) obtidos com acetona, etanol ou hexana na formação de apressórios por *Colletotrichum gloeosporioides*, sobre superfície de poliestireno. Tratamentos: diluições (extrato : água ou solvente : água; v/v) - 1 (1:9); 2 (1:99); 3 (1:999) -. E - extrato; S - solvente puro; T - água destilada esterilizada. Avaliações efetuadas 19 horas após o início dos experimentos. Barras representam o desvio padrão da média.

Figura 12 - Germinação de conídios e formação de apressórios por *Colletotrichum gloeosporioides* em diferentes superfícies. Tratamentos: 1 - BDA (batata-dextrose-ágar); 2 - AA (ágar-água); 3 - poliestireno (suspensão de esporos + glicose); 4 - poliestireno (testemunha; suspensão de esporos sem glicose). Avaliação efetuada após 19 h. T.G. - tubo germinativo; AP - apressório. As barras representam o desvio padrão da média.

Figura 13 - Efeitos de diferentes meios ou superfícies no comprimento e largura do tubo germinativo de *Colletotrichum gloeosporioides*, após 15 h de incubação. Tratamentos: 1 - BDA (batata-dextrose-ágar); 2 - AA (ágar-água); 4 - poliestireno (testemunha; suspensão de esporos sem glicose). As barras representam o desvio padrão da média.

Figura 14 - Efeito de extratos orgânicos obtidos, a partir de folhas secas de *Lippia alba* - forma 1 (A) e forma 2 (B), sobre o crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*, em meio de BDA (batata-dextrose-ágar). Tratamentos: EA -extrato acetônico; CA - controle acetônico; EE - extrato etanólico; CE - controle etanólico; EH - extrato hexânico; CH - controle hexânico; T - testemunha (água destilada esterilizada). Avaliação efetuada após 5 dias de crescimento.

Figura 15 - Efeito de extratos orgânicos (acetona, etanol e hexana) obtidos a partir de tecidos foliar de *Lippia alba* - forma 1 (A) e forma 2 (B), sobre o crescimento de *Colletotrichum gloeosporioides*, após 5 dias. (C) - solvente sozinho (puro). Testemunha - solventes substituídos por água destilada esterilizada.

Figura 16 - Efeito dos extratos aquosos, obtidos a partir de folhas secas de *Lippia alba*, forma 1 e forma 2, sobre o crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* em meio BDA (batata-dextrose-ágar). Tratamentos: EA1 - extrato aquoso da forma 1; EA2 - extrato aquoso da forma 2; T - testemunha (ausência de extrato). Avaliação efetuada após 5 dias de crescimento. As barras representam o desvio padrão da média.