

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EXTRATOS VEGETAIS: POTENCIAL ELICITOR DE
FITOALEXINAS E ATIVIDADE ANTIFÚNGICA EM
ANTRACNOSE DO CAJUEIRO**

**Paulo Roberto Santos Carvalho
Engenheiro Agrônomo**

**JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
abril de 2010**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EXTRATOS VEGETAIS: POTENCIAL ELICITOR DE
FITOALEXINAS E ATIVIDADE ANTIFÚNGICA EM
ANTRACNOSE DO CAJUEIRO**

Paulo Roberto Santos Carvalho

Orientador: Prof. Dr. Modesto Barreto

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Margarete Camargo

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Agronomia (Produção Vegetal).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

abril de 2010

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Paulo Roberto Santos Carvalho nasceu em Floriano, Piauí, filho de Pedro Apóstolo de Carvalho e Maria do Socorro Santos Carvalho. É Engenheiro Agrônomo, graduado em 1977 pela Faculdade de Ciências Agrárias do Pará, em Belém - PA. Obteve o título de Mestre em Fitopatologia, área de concentração em patologia de sementes, em 1981, na Universidade Federal de Viçosa - MG. Iniciou sua carreira profissional na Universidade Federal do Piauí, onde é professor de fitopatologia do Departamento de Fitotecnia do Centro de Ciências Agrárias desde 1979 tendo exercido as funções de chefe do departamento por três vezes e Coordenador do curso de Agronomia. Publicou vários artigos científicos e Ingressou no curso de doutorado em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal, da Unesp/FCAV - Câmpus de Jaboticabal, em 2006.

**À minha Mulher Ceixa a quem amo e
dedico minha vida a 38 anos e meus filhos
Ludmila, Elis e Esdras com carinho,
DEDICO.**

AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte de luz e de paz;

A meus pais Pedro Carvalho (in memoriam) e Socorro Carvalho e minhas tias Adinha (in memoriam) e Flory, fonte da minha vida, minha formação, caráter e personalidade, sem os quais não teria chegado até a realização deste sonho;

A Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias e Universidade Federal do Piauí, pela oportunidade de realização desse sonho;

Aos Coordenadores do Curso de Doutorado Interinstitucional - DINTER, professor Dr. Luiz Evaldo de Moura Pádua (Universidade Federal do Piauí) e professor Dr. Jairo Osvaldo Cazetta (Universidade Estadual Paulista), sustentáculos para que esta oportunidade ocorresse;

Ao Prof. Dr. Modesto Barreto e à Prof^a. Dr^a. Margarete Camargo, pelas sugestões, orientação e em especial pela amizade;

Aos professores Drs. Antonio Baldo Geraldo Martins, Domingos Fornasier Filho, Edson Luís Mendes Coutinho, José Carlos Barbosa, Renato de Melo Prado, Modesto Barreto pelos ensinamentos transmitidos durante o curso;

Aos professores membros das bancas do exame de qualificação e de defesa da tese pelas sugestões;

À professora Dr. Kátia Regina Freitas Schwan-Estrada pela colaboração na metodologia

À Dr^a. Érika Auxiliadora Giacheto Scaloppi pelos ensinamentos e amizade;

Aos colegas do DINTER pela amizade e prazerosa convivência;

Aos professores e amigos Dra. Eulália Maria de Sousa Carvalho e Dr. João Batista Lopes pelo apoio e colaboração ao longo de todo o trabalho;

Às minhas queridas cunhadas Fátima e Amélia pelo apoio nas horas mais difíceis e o incentivo para concretização deste sonho;

Aos meus irmãos, José, Antônio Augusto, Ondina, Carlos Alberto e Pedro Filho fonte de ajuda e companheirismo nas dificuldades ao longo desta importante jornada;

Ao casal amigo Dr. Adeodato e Margareth Salviano grandes incentivadores, durante toda a nossa longa e sincera amizade, para que este sonho se tornasse realidade;

Aos professores Dr. Paulo Roberto Ramalho Silva e Dr. Regina Lúcia Ferreira Gomes pela amizade e incentivo;

Aos funcionários do Departamento de Produção Vegetal/UNESP - Jaboticabal pelo carinho e presteza no atendimento;

Aos técnicos do Laboratório de Fitossanidade Antônia da Cruz Farias (Toinha); e Valdeci Otaviano do Nascimento e ao secretário do departamento de Fitotecnia do CCA/UFPI Sebastião Silva Chaves pela amizade, ajuda e dedicação no preparo de materiais;

A todos que direta ou indiretamente colaboraram na execução deste trabalho.

SUMÁRIO

	Páginas
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. O cajueiro	4
2.2. A antracnose do cajueiro	5
2.3. Caracterização das plantas bioativas	7
2.4. Controle de doenças com extratos de plantas	10
2.5. Indução de fitoalexinas por substâncias elicitoras	13
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1. Avaliação <i>in vitro</i> da atividade antifúngica dos extratos brutos aquosos de plantas	16
3.1.1. Origem do isolado de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> e das plantas estudadas	16
3.1.2. Preparação dos extratos brutos aquosos e avaliação da atividade antifúngica	17
3.1.2.1. Efeito sobre o crescimento micelial e esporulação de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	18
3.1.2.2. Efeito na germinação de conídios e formação de apressórios de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	19
3.2. Avaliação do potencial dos extratos brutos aquosos de plantas para indução de fitoalexinas	21

3.2.1. Determinação das testemunhas positivas para os ensaios com mesocótilo de sorgo e cotilédones de soja	21
3.2.2. Produção de fitoalexinas em mesocótilos estiolados de sorgo	21
3.2.3. Produção de fitoalexinas em cotilédones de soja	23
3.3. Controle da antracnose em folhas de cajueiro	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1. Avaliação in vitro da atividade antifúngica dos extratos	26
4.1.1. Efeito sobre o crescimento micelial e esporulação de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	26
4.1.2. Efeito na germinação de conídios e formação de apressórios	29
4.2. Avaliação do potencial dos extratos para indução de fitoalexinas.	33
4.2.1. Determinação das testemunhas positivas para os ensaios com mesocótilo de sorgo e cotilédones de soja	33
4.2.2. Produção de fitoalexinas em mesocótilos estiolados de sorgo	33
4.2.3. Produção de fitoalexinas em cotilédones de soja	36
4.3. Controle da antracnose em folhas de cajueiro	38
5. CONCLUSÕES	42
6. REFERÊNCIAS	43

LISTA DE TABELAS

	Página
1. Efeito de diferentes concentrações do extrato bruto aquoso (EBA) de alecrim pimenta, nim e urtiga no diâmetro de colônia, de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	26
2. Efeito de diferentes concentrações do extrato bruto aquoso (EBA) de alecrim pimenta, nim e urtiga na esporulação de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	28
3. Efeito de diferentes concentrações de extrato bruto aquoso (EBA) de alecrim pimenta, nim e urtiga na germinação de conídios de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	30
4. Produção das fitoalexinas deoxiantocianidinas em mesocótilos de sorgo após o tratamento com diferentes concentrações dos extratos brutos aquosos (EBA) de alecrim pimenta, nim e urtiga	35
5. Produção da fitoalexina gliceolina em cotilédones de soja, após o tratamento com diferentes concentrações dos extratos brutos aquosos de alecrim pimenta, nim e urtiga	36
6. Severidade da antracnose em folhas destacadas de cajueiro tratadas com diferentes concentrações do EBA de alecrim pimenta, nim e urtiga ...	38

LISTA DE FIGURAS

		Página
1.	Cajueiros dos grupos comerciais: comum e anão precoce	5
2.	Sintomatologia da antracnose do cajueiro: manchas em folhas (A), em inflorescência (B), frutos (C) e acérvulos em lesões (D)	7
3.	Plantas Bioativas: A- alecrim pimenta (<i>Lippia sidoides</i>), B- urtiga (<i>Urtica dióica</i>) e C- nim (<i>Azadirachia indica</i>)	9
4.	Colônia de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> isolado de folhas de cajueiro anão precoce com sintomas de antracnose	16
5.	Biomassa de folhas secas trituradas de alecrim pimenta, nim e urtiga (A), e seus extratos brutos aquosos prontos para utilização (B)	18
6.	Placas de Petri com lâminas, contendo meio de cultura associado aos tratamentos com extratos brutos aquosos de plantas, utilizadas para avaliação de germinação de conídios de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> ...	20
7.	Seqüência de etapas do bioensaio para indução de fitoalexinas em hipocótilos estiolados de sorgo: sementes distribuídas em papel de germinação (a), enroladas em cartuchos (b), e incubadas (c), hipocótilos estiolados (d), pulverizados com os extratos vegetais (e) e fitoalexinas sintetizadas (f)	23
8.	Desenvolvimento micelial de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> em meio de cultura BDA associado aos extratos brutos aquosos de plantas	27

9. Efeito dos Extratos brutos aquosos das plantas estudadas sobre a germinação de esporos de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> em meio de cultura BDA, apresentando deformações no tubo germinativo	31
10. Efeito dos Extratos brutos aquosos das plantas estudadas sobre a formação de apressórios de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> . Test.=testemunha; N=nim (5%, 10%, 15%); U=urtiga (5%)	31
11. Resultados da Determinação das testemunhas positivas para os ensaios com mesocótilo de sorgo (A) e cotilédones de soja (B)	33
12. Efeito dos Extratos brutos aquosos: nim 15% (N15), alecrim pimenta 15% (A15), urtiga 15% (U15) e das testemunhas: positiva (TP) e negativa (TN) sobre a indução de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo	34
13. Fitoalexinas deoxiantocianidinas extraídas de mesocótilos de sorgo tratados com extratos brutos aquosos de Alecrim pimenta (A); Nim (N); urtiga (U) e das Testemunhas positiva (TP) e negativa (TN). A pigmentação indica o teor de fitoalexina sintetizada	34
14. Fitoalexina gliceolina extraídas de cotilédones de soja tratados com extratos brutos aquosos a 15%. A pigmentação indica o teor de fitoalexina sintetizada. (TN = Testemunha negativa; TP = testemunha positiva)	37
15. Reação de folhas destacadas de cajueiro, pulverizadas com os Extratos brutos aquosos, à inoculação com <i>Colletotricum gloeosporioides</i> agente da antracnose do cajueiro	39

EXTRATOS VEGETAIS: POTENCIAL ELICITOR DE FITOALEXINAS E ATIVIDADE ANTIFÚNGICA EM ANTRACNOSE DO CAJUEIRO

RESUMO - Plantas e extratos vegetais podem apresentar ação antifúngica e de indução de defesa em função da presença de compostos com características elicitoras. Nesse sentido, foram objetivos do trabalho avaliar o efeito antifúngico dos extratos brutos aquosos de alecrim pimenta, nim e urtiga sobre *Colletotrichum gloeosporioides*; o potencial como elicitores de fitoalexina e o efeito de controle da antracnose em folhas destacadas de cajueiro. Os extratos brutos aquosos em três concentrações (5%, 10% e 15%) foram adicionados ao meio de cultura BDA para avaliar a ação sobre o crescimento micelial e esporulação e ao substrato Ágar-água para avaliar o efeito na germinação dos conídios e formação de apressórios. O potencial elicitor foi investigado em mesocótilos estiolados de sorgo e cotilédones de soja, determinando a capacidade elicitora das fitoalexinas deoxiantocianidina e gliceolina, respectivamente. Alecrim pimenta a 10% e 15% inibiu totalmente o crescimento micelial de *C. gloeosporioides*, a esporulação e germinação dos conídios. Nim inibiu parcialmente o crescimento micelial, esporulação e germinação dos conídios de forma proporcional à concentração usada. Urtiga estimulou o crescimento micelial, mas inibiu parcialmente a esporulação e a germinação. Apressórios não foram formados na presença dos três extratos brutos aquosos. Apenas alecrim pimenta a 15% mostrou potencial elicitor de deoxiantocianidina em sorgo. Já em soja foi observado potencial elicitor de gliceolina, embora com acentuada variação, tanto pelos três extratos brutos aquosos quanto pelas concentrações estudadas. O controle da antracnose em folhas destacadas de cajueiro foi observado em todas as concentrações dos extratos de alecrim pimenta e nim e, com urtiga a 15%. O maior efeito de controle foi proporcionado, igualmente, pelas concentrações do extrato de alecrim pimenta.

Palavras-chave: *Colletotrichum gloeosporioides*, controle alternativo, indução de resistência, *Anacardium occidentale*.

VEGETABLE EXTRACTS: PHYTOALEXINS ELICITOR POTENTIAL AND ANTIFUNGAL ACTIVITY ANTHRACNOSE OF THE CASHEW PLANT

ABSTRACT - The use of plant extracts have shown antifungal and induction of defense due to the presence of compounds with characteristics elicitors. Therefore, the goals were to evaluate the antifungal effect of aqueous extracts of rosemary pepper, neem and nettle on *Colletotrichum gloeosporioides* and the potential as elicitors of phytoalexin and the effect of control of anthracnose in detached leaves of cashew plant. The extracts of three concentrations (5, 10 and 15%) were added to the culture medium to evaluate the effect on the mycelial growth and sporulation or to the water-agar substrate to evaluate the effect on conidial germination and apressoria formation. The potential elicitor was investigated in etiolated sorghum mesocotyl and soybean cotyledons, determining the ability of the phytoalexin elicitor deoxyanthocyanidin and gliceollin respectively. Rosemary Pepper 10 and 15% completely inhibited the mycelial growth of *C. gloeosporioides* and sporulation and germination. Nim partially inhibited the mycelial growth, sporulation and spore germination in proportion to the concentration used. Nettle stimulated mycelial growth, but partially inhibited the sporulation and germination. Appressoria were not formed in the presence of the three extracts. Only rosemary pepper 15% showed potential elicitor of deoxyanthocyanidin in sorghum. In soybean, potential elicitor of gliceolina, although with marked variation, was observed so the three extracts as the concentration. Control of anthracnose in detached leaves of cashew plant was observed at all concentrations of extracts of rosemary pepper and neem and nettle to 15%. The biggest effect of control was provided equally by the concentrations of the extract of rosemary pepper.

Keywords: *Colletotrichum gloeosporioides*, alternative control, induced resistance, *Anacardium occidentale*.

1. INTRODUÇÃO

O caju constitui um produto de elevada importância econômico-social para vários países do terceiro mundo como Índia, alguns países africanos e o Brasil, onde o cultivo concentra-se na região Nordeste (ARAÚJO & SILVA, 1995). A produção brasileira de castanha de caju em 2008 atingiu 239.702 toneladas, sendo o Ceará o maior produtor (121.045 t), seguido pelo Piauí (56.279 t) e Rio Grande do Norte (42.593 t) (IBGE, 2009). A castanha (fruto verdadeiro) permanece como principal produto na exploração comercial do cajueiro, de onde se obtêm a amêndoa e o LCC (Líquido da Casca da Castanha), utilizado na indústria química, destinados, em grande parte, ao mercado externo, principal responsável pela sustentação comercial do produto. Os Estados Unidos da América respondem pela maior parte das importações do produto brasileiro. A outra opção na exploração da cajucultura é o pedúnculo (pseudofruto) que além do consumo in natura, pode ser utilizado na fabricação dos mais variados doces e bebidas. Do suco fresco, clarificado, engarrafado e cozido em banho-maria, resulta a CAJUÍNA, bebida refrescante, saborosa e natural, sem aditivos químicos. (CAJUCULTURA, 2010).

O cajueiro, *Anacardium occidentale* L., convive com vários competidores parasitários, entre os quais fungos fitopatogênicos de diversas espécies. Segundo MENEZES (2005), a antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc., é a doença mais importante da cultura podendo ocorrer em qualquer fase do desenvolvimento, desde o viveiro, onde os prejuízos decorrentes são detectados de modo muito acentuado, até a fase de produção. Nas folhas, manchas necróticas provocam desfolhamento, de forma mais acentuada, na fase que antecede o início da floração. Na inflorescência ocorre crestamento e queda de flores, sendo comum a presença de lesões necróticas na haste floral, que evoluem de modo a atingir toda a inflorescência que seca completamente, e lesões escuras atingem os frutos novos e maduros provocando queda, deformações e atrofiamento. Este conjunto de sintomas reduz a produção principalmente nas épocas de maior umidade.

O controle dessa importante doença vem sendo feito, ao longo dos anos quase que exclusivamente com o emprego de fungicidas químicos sintéticos, como oxiclreto de cobre, mancozeb, bitertanol, triadimenol e triforine, aplicados em pulverizações iniciadas quando da emissão das folhas novas, logo após as primeiras chuvas, e durante a floração em intervalos quinzenais (FREIRE & ROSSETTI, 1991; OLIVEIRA, 2002; MENEZES, 2005), mesmo com as restrições legais, já que, entre estes produtos, somente oxiclreto de cobre tem registro oficial para controle de *C. gloeosporioides* em cajueiro (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2010).

Esta forma de controle, mesmo sendo a que apresenta eficiência reconhecida, contribui para acentuar os danos ambientais, bem como, pode levar danos à saúde dos consumidores, principalmente pelo crescimento do consumo in natura do pseudofruto ou na forma de suco, além de favorecer a seleção de raças resistentes de patógenos ao princípio ativo dos produtos (GHINI & KIMATI, 2000). Além dos efeitos nocivos diretos já conhecidos, o controle da antracnose do cajueiro com agrotóxicos sintéticos, também pode interferir com outras formas de produção como a contaminação da apicultura, já que nas áreas do semi-árido há uma relação intensa entre a cajucultura e a apicultura, pois durante a estiagem a abelha encontra, na florada do caju, o alimento necessário ao seu sustento. Nesse contexto, termos como “agricultura alternativa” ou “agricultura sustentável” obtêm expressão política (ZADOKS, 1992) e estimulam a busca de novas medidas de proteção das plantas contra as doenças. Em decorrência disso, países da comunidade européia, a vários anos vêm impondo restrições crescentes ao uso dos agrotóxicos e incentivando pesquisadores e produtores a buscarem novos caminhos para o controle das doenças nas mais diferentes culturas (GULLINO & KUIJPERS, 1994).

Na natureza, a maioria das plantas são resistentes aos diferentes patógenos com os quais convivem e essa resistência pode estar relacionada à existência de substâncias antifúngicas naturalmente produzidas (LE MOS et al., 1990). Portanto, espera-se que a descoberta de metabólitos naturais sintetizados pelas diversas plantas que compõem a flora nativa e que apresentam efeito antimicrobiano, possa contribuir para o controle das doenças das plantas. A exploração da atividade biológica de

compostos secundários presentes no extrato bruto ou óleo essencial de plantas pode se constituir, ao lado da indução de resistência, em mais uma forma potencial de controle alternativo de doenças em plantas cultivadas.

Trabalhos desenvolvidos com extratos obtidos a partir de plantas medicinais da flora nativa têm indicado o potencial das mesmas no controle de alguns fitopatógenos, tanto por sua ação fungitóxica direta, inibindo o crescimento micelial e a germinação de esporos, quanto pela indução de fitoalexinas, indicando a presença de compostos com características elicitoras. A determinação da atividade biológica dessas moléculas, com respeito à atividade elicitora ou antimicrobiana, poderão contribuir para a aquisição de maiores conhecimentos que reforcem sua possível utilização como um método alternativo de controle de doença de plantas (SCHWAN-ESTRADA et al., 2000).

Neste contexto, o presente trabalho foi conduzido com o objetivo de avaliar o potencial de extratos brutos aquosos de folhas de duas plantas medicinais da flora nativa do Piauí (alecrim pimenta e urtiga) e uma exótica (nim), no controle de *Colletotrichum gloeosporioide*, agente causal da antracnose do cajueiro.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O cajueiro

O cajueiro é uma frutífera tropical da espécie *Anacardium occidentale* L. pertencente à família Anacardiáceae. São descritas, pela taxonomia clássica, 21 espécies de cajueiro, das quais somente três não são encontradas no Brasil (CAJUCULTURA, 2010). A origem do cajueiro baseia-se em discussão fundamentada em provas circunstanciais que indicam, de forma convincente, o Brasil, ou pelo menos todo o Norte da América do Sul como o centro de origem da espécie cultivada, contudo o cajueiro distribui-se por todos os continentes com clima tropical (JOHNSON, 1973; MOTA, 1982). No Brasil, o cajueiro encontra-se em todos os estados, adaptando-se melhor à região Nordeste, distribuindo-se tanto na região costeira, onde faz parte da vegetação de praias e dunas além das formações de restingas, como na região do semi-árido, sendo comercialmente cultivado nas duas regiões (LIMA, 1988)

Planta perene, o cajueiro cultivado apresenta-se em dois grupos: o comum, também conhecido por “gigante”, com grande variabilidade genética e cuja copa com ramificação baixa, atinge altura média de 8 a 12m e diâmetro médio (envergadura) entre 12 a 14m podendo atingir até 15m de altura e diâmetro superior a 20m, dependendo do genótipo e das condições de clima e solo; e o cajueiro anão precoce, selecionado para cultivo comercial na década de oitenta, a altura média não ultrapassa quatro metros e a envergadura varia entre 6m e 8m, iniciando a frutificação no primeiro ano de plantio (Figura 1) (ARAÚJO & SILVA, 1995). Nos dois grupos as folhas são simples, alternadas, de aspecto subcoriáceo, glabras e curto-pecioladas, medindo de 10 a 20cm de comprimento por 6 a 12 cm de largura. Observam-se duas fases de crescimento por ciclo: um fluxo vegetativo e um fluxo reprodutivo que gera uma inflorescência terminal. O fruto, um aquênio reniforme, consiste do epicarpo, mesocarpo, endocarpo e a amêndoa que é coberta por uma película. O mesocarpo é

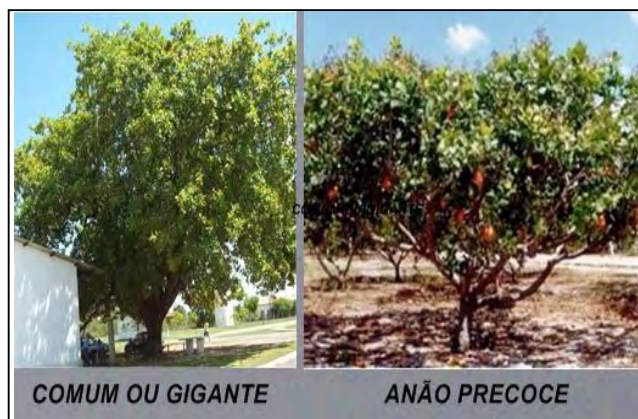


Figura 1 - Cajueiros dos grupos comerciais: comum e anão precoce.

constituído por uma camada de células esponjosas onde se localiza o LCC (Líquido da Casca da Castanha) com grande valor comercial. (ARAÚJO & SILVA, 1995; CAJUCULTURA, 2010).

Segundo ARAÚJO & SILVA (1995), a precipitação pluviométrica adequada ao cajueiro está na faixa de 800 a 1600 mm anuais, enquanto que a umidade relativa do ar considerada mais indicada à cultura situa-se entre 70% e 80% e a temperatura média de 27 °C é a mais apropriada, apesar de suportar temperaturas médias mais elevadas (33 a 37°C). Estas condições climáticas também favorecem o desenvolvimento de doenças fúngicas, principalmente da parte aérea da planta.

2.2. A antracnose do cajueiro

Muito embora o cajueiro seja hospedeiro de inúmeros organismos patogênicos, apenas alguns destes fitopatógenos provocam doença com importância econômica para a cultura. A antracnose é a doença mais importante do cajueiro, podendo ocorrer em qualquer fase de desenvolvimento da planta. No Nordeste, a doença encontra-se presente em todas as áreas de cultivo, sendo bastante severa em épocas mais úmidas e temperaturas amenas, ao redor de 25°C. O Agente causal é o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. Sacc. (anamorfo) que corresponde à *Glomerella cingulata*, na forma teleomórfica (perfeita). O estágio teleomórfico não tem sido observado, em

condições naturais, causando danos ao cajueiro, sendo a fase mitospórica a responsável pelos prejuízos à cultura (ARAÚJO & SILVA, 1995; MENEZES, 2005).

Os sintomas da antracnose aparecem nos tecidos jovens da planta. Nas folhas, as manchas necróticas apresentam coloração pardo-avermelhada, formato irregular e de tamanho variável de acordo com o local de penetração do patógeno. O fungo pode afetar também de modo eficiente as inflorescências, sobre as quais provoca lesões escuras, deprimidas, às vezes com exsudação de gotículas reluzentes de goma. Os tecidos necrosados impedem o fluxo normal da seiva, sobrevivendo a murcha e posteriormente a morte da inflorescência causando a queda das flores e frutos jovens, com enormes prejuízos no pomar. Nos frutos, a doença pode ocorrer em todas as fases de seu desenvolvimento. Os frutos novos tornam-se escuros, deformados e atrofiados, enquanto os maduros apresentam lesões necróticas, escuras, deprimidas, atingindo boa extensão da sua superfície e, frequentemente, exibindo fendilhamento da área necrosada (Figura 2) (OLIVEIRA, 2002; MENEZES, 2005).

Os prejuízos decorrentes da antracnose são detectados de modo acentuado também em viveiro. Com efeito, tem sido observada, em diversas oportunidades, a morte de elevado número de mudas em virtude da infecção por *C. gloeosporioides*. Em mudas, os sintomas foliares são semelhantes aos descritos para plantas adultas e a infecção pode estender-se às partes herbáceas das plantas, provocando ampla necrose (ARAÚJO & SILVA, 1995).

Em condição natural, no campo, o agente etiológico da antracnose do cajueiro manifesta-se apenas na fase anamórfica e produz conídios hialinos, unicelulares, em acérvulos, com ou sem setas que, em condições úmidas, exibem uma massa conidial de coloração alaranjada, creme ou escura, na superfície do tecido afetado. O fungo sobrevive como saprófita no tecido morto, podendo ser disseminado principalmente através de respingos de chuva e mudas infectadas. No processo de infecção, os conídios do patógeno, em contato com a superfície do hospedeiro, germinam, produzindo apressórios que possibilitam a fixação e penetração direta em qualquer órgão da parte aérea da planta (MENEZES, 2005).



Figura 2 - Sintomatologia da antracnose do cajueiro: manchas em folhas (A), em inflorescência (B), frutos (C) e acérvulos em lesões (D)

2.3. Caracterização das plantas bioativas

Lippia sidoides Cham é uma planta arbustiva nativa do Nordeste do Brasil, endêmica do bioma caatinga, encontrada principalmente nos estados do Ceará e Rio Grande do Norte. Pertencente à família Verbenaceae, é conhecida popularmente como alecrim-pimenta ou estrepá-cavalo (Figura 3A) (MARTINS, 2000). É um grande arbusto caducifólio, ereto, muito ramificado e quebradiço, possui cerca de 2 a 3 m de altura. Folhas simples, opostas, crenadas, aromáticas com odor canforáceo, picantes, finamente serradas, pequenas com 2 cm de comprimento em média; flores pequenas, brancas, inflorescências tetragonais, em espigas axilares; os frutos são do tipo aquênio, muito pequenos e as sementes raramente germinam (LORENZI & MATOS, 2002).

Esta espécie possui diversas indicações terapêuticas e apresenta propriedades antimicrobianas, graças à presença de timol e carvacrol em seu óleo essencial, o que lhe confere uma grande importância econômica (SILVA & CASALI, 2000; COSTA, 2006). As folhas contêm 3,8% de óleo essencial na biomassa fresca e 5,4% na biomassa seca de suas folhas. O óleo essencial analisado por cromatografia gasosa contém 73,1% de Timol como principal componente (NUNES et al., 2005).

Outra planta com características bioativas é a *Urtica dioica*, conhecida popularmente por urtiga (Figura 3B). No nordeste do Brasil é uma planta daninha comum que pode causar uma larga escala de reações cutâneas pelo contato com os pêlos presente nos caules e nas folhas por onde são liberadas diversas substâncias biologicamente ativas (HADDAD JÚNIOR, 2004; LIMA et al. 2008). No entanto, *U. dioica* tem uma longa história de uso ao redor do mundo, como medicamento, alimento e produção têxtil. É uma planta herbácea, perene possui rizomas lenhosos, caule simples ou pouco ramificado com 40-100 cm de altura. O caule, pecíolo e folhas são cobertos densamente ou, às vezes, escassamente com pêlos. As folhas são ovais, às vezes lanceoladas (LIMA et al., 2008). Essa espécie possui componentes pertencentes a várias classes químicas, tais como ácidos graxos, ácidos triterpênicos, cumarinas, fenilpropanóides, lignanas, ceramidas e flavonóides glicosilados isolados primeiro das flores (LIMA et al. 2008)

O Nim, ou Amargosa (*Azadirachia indica* A. Juss), é uma planta de origem asiática, natural de Burma e das regiões áridas do subcontinente indiano (Figura 3C). Esta espécie está distribuída também nas áreas tropicais e subtropicais da África, Américas e Austrália (NEVES et al., 2003). Com recente introdução na região Nordeste já é amplamente distribuída na região norte do Piauí utilizada na arborização urbana.

De acordo com SCHMUTTERER (1990), é uma planta perene e decídua, bastante resistente e de crescimento rápido, podendo, caso haja condições edafoclimáticas favoráveis, atingir até 25 metros de altura. Possui uma copa atraente de folhagem verde escuro que pode atingir até 10 m de diâmetro.

As folhas são verde-escuras, compostas e imparipinadas, com frequência aglomerada nos extremos dos ramos simples e sem estípulas. As flores são de coloração branca e aromática com odor de mel, reunidas em inflorescências densas, com os estames crescentes formando um tubo (por união dos filamentos) actinomórficas, pentâmeras e hermafroditas. O fruto é uma baga ovalada com 1,5 a 2,0 cm de comprimento e, quando maduro, apresenta polpa amarelada e casca branca dura contendo um óleo marrom no interior de uma semente ou, raramente, em duas (SCHMUTTERER, 1990; NEVES et al., 2003).



Figura 3 - Plantas Bioativas: A- alecrim pimenta (*Lippia sidoides*), B- urtiga (*Urtica dióica*) e C- nim (*Azadirachia indica*).

O nim é utilizado há mais de 2000 anos na Índia para controle de insetos pragas (mosca-branca, minadora, brasileirinho, carrapato, lagartas e pragas de grãos armazenados) nematóide, alguns fungos, bactérias e vírus, na medicina humana e animal. Do ponto de vista químico, uma característica comum às espécies da família

Meliaceae é a presença de triterpenos oxigenados, conhecidos como meliacinas (NEVES et al., 2003).

De acordo com BISWAS et al. (2002) desde 1942, quando foi isolado o primeiro composto do óleo de nim, mais de 135 compostos foram isolados a partir de diferentes partes da planta. Os isoprenóides incluem diterpenóides e triterpenóides, os quais contêm protomeliacinas, limnóides, azadirona e seus derivados, vilasinina e csecomelicianinas como a nimbina, salamina e azadiractina. Dentre todos estes compostos, o principal princípio ativo encontrado no nim é a Azadiractina, devido aos diversos efeitos causados nos organismos principalmente nos insetos, no entanto, a quantidade deste composto presente na semente de nim pode variar consideravelmente devido a fatores ambientais e possivelmente também por razões genéticas, sendo que a maior quantidade de Azadiractina obtida foi de aproximadamente 10 g/kg de semente (SCHUMUTTERER, 1990).

2.4. Controle de doenças com extratos de plantas

Após a segunda grande guerra, a agricultura passou a ser considerada atividade de interesse fundamental na economia dos povos. Até então, a única forma de combater as pragas agrícolas que se conhecia era através de plantas com ação pesticida. Com o fim da segunda guerra mundial, os agrotóxicos, antes utilizados para combater homens e desinfetar áreas de invasão, foram rebatizados e passaram a se chamar defensivos, para serem empregados em larga escala no controle das pragas agrícolas. Somente o emprego desse método, entretanto, não está conseguindo reduzir as perdas, apesar da grande quantidade anualmente despejada nas lavouras. O volume de agrotóxicos usados no mundo chegou a ultrapassar 20.000 toneladas de ingredientes ativos na década de 90 (NEVES et al., 2003). Segundo estes autores, até há pouco tempo, o homem assistia sem muita preocupação ao uso indiscriminado de agrotóxicos que contaminam o solo e os recursos hídricos como os aquíferos, lagos e rios, além de causarem danos à população. Silenciosamente, verificou-se o crescente número de problemas decorrentes da utilização destes insumos e mesmo com a difícil

adaptação aos novos meios de vida, o mundo assiste hoje a uma reformulação no modo de vida. Valores naturais e ecológicos retornam com grande força, na determinação de novos preceitos, em todas as áreas do conhecimento científico e na vida cotidiana das pessoas.

Trabalhos desenvolvidos com extrato bruto ou óleo essencial obtidos a partir de plantas medicinais da flora nativa indicam o potencial das mesmas no controle de alguns fitopatógenos, tanto por sua ação fungitóxica direta, inibindo o crescimento micelial e a germinação de esporos, quanto pela indução de fitoalexinas, indicando a presença de compostos com características de elicitores (SCHWAN-ESTRADA et al., 2000). Segundo os autores o fracionamento dos metabólitos secundários dessas plantas, bem como a determinação da atividade biológica dessas moléculas, com respeito à atividade elicitora ou antimicrobiana, poderão contribuir para aquisição de maiores conhecimentos que reforcem sua possível utilização como um método de controle de doença de planta.

DINIZ et al. (2006) avaliaram o efeito de produtos alternativos para controle da requeima do tomateiro e demonstraram que o óleo de nim a 0,5%, pulverizado na parte aérea das plantas de tomateiro em condições de campo, reduziu a severidade da doença em 57,63%, a área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACDP) em 44,88% e em 76,30 a taxa de progresso da doença.

OLIVEIRA et al. (1998) avaliaram a ação antifúngica do Alecrim-Pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) sobre *C. gloeosporioides in vitro*. Os resultados foram obtidos medindo-se o diâmetro das colônias e observando as deformações celulares e/ou micelial. Reduções de até 96,8% foram observadas no diâmetro das colônias e no teste de microcultura observou-se um desenvolvimento atípico da colônia.

A avaliação *in vitro* do efeito metabólico de duas formas de *Lippia alba*, conhecida como erva cidreira brasileira, sobre o fungo *C. gloeosporioides*, demonstrou que substância(s) presente(s) nas folhas altera(m) o padrão de germinação dos conídios, aumentando o comprimento e a largura do tubo germinativo e impedindo a formação de apressórios. Utilizando-se esses extratos, em meio de BDA em placas de

Petri, foi demonstrado também o efeito dos mesmos sobre o crescimento micelial do fungo (SANTOS & PASCHOLATI, 1996).

PIMENTEL et al. (1995) estudaram *in vitro* a inibição do fungo *C. gloeosporioides* por um composto de extratos cítricos a 40%, em concentrações crescentes, sobre o desenvolvimento micelial e observaram uma ação do produto sobre o fungo, com inibição progressiva do crescimento em relação às concentrações do produto, não tendo sido observado nenhum crescimento do patógeno na concentração de 20.000 $\mu\text{L.L}^{-1}$.

PESSOA et al. (1996) avaliaram o efeito da tintura de Alecrim-Pimenta, nas concentrações de 1%; 5% e 10 %, sobre o fungo *C. gloeosporioides* em meio BDA em placas de Petri. Os resultados demonstraram uma ação inibidora da tintura sobre o desenvolvimento micelial das colônias, com valores médios de inibição, diretamente proporcionais às concentrações, de 34%, 77% e 97,7 %, respectivamente.

Ensaio conduzido *in vitro* por SILVEIRA et al. (1994), mostrou que extratos de *Burseraceae* em placas de Petri na proporção de 1:9 ml (extrato: meio), inibiram o crescimento de *C. gloeosporioides* em relação a testemunha e CATARINO et al. (1998), mostraram inibição de 18% a 54% no crescimento micelial de *C. gloeosporioides* e *Botrytis cineria*, utilizando os extratos clorofórmicos de folhas de *Tagetes minuta* (cravo de defunto) e hexânico de folhas de *Vernonia polyanthes* (assa-peixe).

BONALDO et al. (2004), com o objetivo de verificar o potencial de *Corymbia citriodora* no controle alternativo de antracnose em pepino, avaliaram a fungitoxicidade *in vitro* do extrato aquoso (EA) desta essência florestal, autoclavado ou não autoclavado, nas concentrações de 0,1, 1, 5, 10, 15, 20 e 25% sobre conídios de *Colletotrichum lagenarium*. Houve inibição total na germinação de esporos e formação de apressórios de *C. lagenarium* em concentrações de 20% e 1% do EA autoclavado, respectivamente. Para o extrato não autoclavado houve 75% de inibição da germinação de esporos em 25% do EA e inibição total da formação de apressórios em 15% do EA.

Extrato aquoso de folhas frescas de *C. citriodora*, em concentrações acima de 20%, também foram eficientes para inibir em 100% o crescimento micelial de *Colletotrichum sublineolum*, *Phytophthora* sp. e *Sclerotium rolfsii*, em 75% o de

Rhizoctonia solani e em 45% o de *Alternaria alternata* em ensaios *in vitro* (BONALDO et al., 2007).

LIMA et al. (2008) relatam a ação antifúngica *in vitro* para o extrato da *U. dioica* sobre várias espécies de fungos incluindo espécies fitopatogênicas como *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Aspergillus flavus*, *Ceratocystis ulmi*, *Phoma exigua*, *Phytophthora carotovora*.

2.5. Indução de fitoalexinas por substâncias elicitoras

Substâncias bióticas e abióticas, como os extratos vegetais, podem desencadear nas plantas a indução de resistência (indução de proteção, imunidade adquirida ou resistência sistêmica adquirida). Segundo SCHWAN-ESTRADA et al. (2000), esta reação envolve a ativação de mecanismos de defesa latentes, existentes nas plantas, em resposta ao tratamento com as substâncias indutoras. Esses mecanismos de resistência induzida podem ser estruturais ou mecânicos, como as papila, lignificação e tilose, ou bioquímicos, como o acúmulo de fitoalexinas e de proteínas relacionadas à patogênese.

As fitoalexinas são metabólitos secundários, antimicrobianos, de baixos pesos moleculares, e produzidos pelas plantas em resposta ao estresse físico, químico ou biológico, sendo capazes de reduzir a atividade de agentes patogênicos nos tecidos das plantas (SCHWAN-ESTRADA et al., 2000). De forma geral, o modo de ação das fitoalexinas inclui granulação citoplasmática, desorganização dos conteúdos celulares, ruptura da membrana plasmática e inibição de enzimas fúngicas. Esses efeitos refletem-se na inibição da germinação e alongação do tubo germinativo e redução ou inibição do crescimento micelial (LO et al., 1996).

DMITRIEV et al. (1990) observaram a acumulação de duas fitoalexinas em escamas de bulbos de cebola em resposta à inoculação com uma linhagem de *Botrytis cinerea* não patogênica à cebola. Estes compostos foram chamados tsibulinas (1d e 2d). As duas fitoalexinas acumularam em lesões pequenas (reação resistente) nos tecidos da planta como resposta à inoculação com *B. cinerea*, coincidindo com a

restrição das hifas de infecção dentro das lesões. As mesmas fitoalexinas não acumularam em lesões grandes em escamas de bulbos de cebola em resposta à inoculação (reação susceptível).

Segundo SMITH (1996), mais de 300 fitoalexinas já foram caracterizadas entre diferentes classes de compostos químicos como cumarinas, diterpenos e flavonoides, entre outras, tendo sido identificadas em mais de 20 famílias de vegetais superiores. NICHOLSON et al. (1987) relataram que, em sorgo, já foram identificadas quatro fitoalexinas (flavonoides 3-deoxiantocianidinas): luteolinidina, 5-metoxiluteolinidina, apigeninidina, e éster do ácido cafeico de arabinizol 5-O-apigeninidina. No caso da soja, a fitoalexina gliceolina (pterocarpenóides) mostra-se importante na interação dessa leguminosa com fitopatógenos (BURDEN & BAILEY, 1975).

Com o objetivo de demonstrar a existência de substâncias extracelulares em uredíniosporos de *Hemileia vastatrix*, capazes de desencadear a formação de fitoalexinas, GUZZO (1989) utilizou bioensaios com cotilédones de soja. Os resultados mostram a eficácia desta metodologia, sendo observada a síntese da fitoalexina gliceolina nos cotilédones de soja tratados.

YAMAOKA et al. (1990), avaliando a capacidade de extratos de conídios e mucilagem conidial de *Colletotrichum graminicola*, como elicitores de fitoalexinas em mesocótilo de sorgo, mostraram que a acumulação da fitoalexina deoxiantocianidina nos tecidos de mesocótilos ocorreu de forma linear em relação ao tempo de tratamento e mostrou resposta igualmente linear em relação às concentrações dos extratos.

Mesocótilos estiolados de sorgo e cotilédones de soja mostram-se como excelentes ferramentas para estudos envolvendo a ação elicitora de moléculas de origem bióticas ou abióticas (SCHWAN-ESTRADA et al., 2000). Utilizando esta metodologia, STANGARLIN et al. (1999) avaliaram o potencial para indução de fitoalexinas dos extratos brutos de 15 plantas medicinais, dos fungos *Saccharomyces cerevisiae* e *Colletotrichum graminicola* e luz ultravioleta como fator abiótico, obtendo resultados variados de acordo com o tratamento utilizado.

Estudando o potencial do extrato aquoso de eucalipto no controle alternativo da antracnose do pepino (*Colletotrichum lagenarium*), BONALDO et al. (2004) avaliaram a

capacidade do extrato em induzir a síntese de fitoalexinas utilizando bioensaio com mesocótilos de sorgo (*Sorghum bicolor*) e cotilédones de soja (*Glycine Max*) e observaram a síntese de deoxiantocianidinas em sorgo a partir da concentração de 1% e gliceolina em soja a partir de 15% de concentração.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram conduzidos na Universidade Federal do Piauí, Centro de Ciências Agrárias, em Teresina – Piauí (CCA/UFPI), (05°05'S e 42°49'W), no período de janeiro a outubro de 2008.

3.1. Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica dos extratos brutos aquosos de plantas

3.1.1. Origem do isolado de *Colletotrichum gloeosporioides* e das plantas estudadas

O fungo *Colletotrichum gloeosporioides* foi isolado de folhas de cajueiro anão-precoces, clone CCP 76, no primeiro estágio vegetativo (coloração marrom claro) com lesões típicas da antracnose, coletadas de plantas com 5 anos de idade, pertencentes à coleção do Setor de Fruticultura do Departamento de Fitotecnia (CCA/UFPI). Os isolados foram cultivados em placas em meio de cultura BDA, e preservados a 4 °C para utilização nos ensaios (Figura 4).

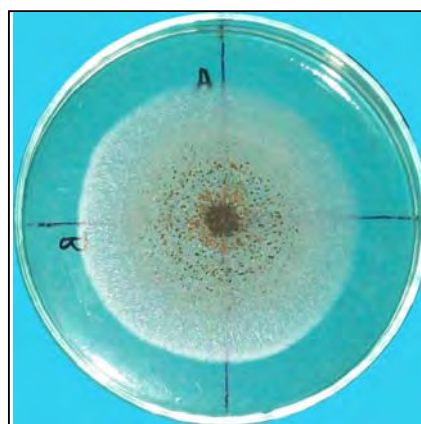


Figura 4 - Colônia de *Colletotrichum gloeosporioides* isolado de folhas de cajueiro anão precoce com sintomas de antracnose.

Foram avaliados os Extratos Brutos Aquosos (EBA) de três espécies de plantas: alecrim pimenta (*Lippia sidoides* Cham) e urtiga (*Urtica dioica* L.) representantes da flora regional do Piauí, e nim (*Azadirachia indica* A. Juss), uma espécie exótica. Para todas as espécies foram utilizadas folhas coletadas no horto do Núcleo de Plantas Medicinais (NUPLAM/UFPI) ou da vegetação nativa existente no câmpus.

3.1.2. Preparação dos extratos brutos aquosos e avaliação da atividade antifúngica

As folhas das três plantas estudadas foram coletadas todas no mesmo horário, entre oito e nove da manhã, com o objetivo de eliminar o efeito temporal sobre o teor das substâncias bioativas sintetizadas pelas plantas (SILVA et al., 1999). Após a coleta as folhas foram separadas dos ramos e secas em estufa a 40°C, trituradas em liquidificador doméstico até obtenção da biomassa seca, na forma de um pó fino (Figura 5), que foi armazenada em recipiente fechado à temperatura ambiente para utilização em todos os ensaios (RADÜNZ et al., 2002; COSTA et al., 2005). Os extratos brutos aquosos (EBAs) foram obtidos adicionando-se 15 g de biomassa seca para cada 100 mL de água destilada estéril. As misturas foram agitadas por cinco minutos em agitador magnético e deixadas em repouso à temperatura ambiente por 30 minutos. Posteriormente, foram novamente agitadas por cinco minutos, filtradas em tecido sintético e centrifugadas a 4000 rpm durante 5 minutos. Os sobrenadantes resultantes foram coletados obtendo-se assim os extratos na concentração de 15 % a partir dos quais foram preparadas, por diluição, as demais concentrações testadas (10 % e 5 %) (Figura 5).

A atividade antifúngica dos extratos brutos foi avaliada sobre o crescimento micelial, esporulação, germinação de conídios e na formação de apressórios de *C. gloeosporioides*. Os ensaios foram conduzidos em condições de laboratório, em delineamento estatístico inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 x 3 + 1 (3 EBAs, 3 concentrações dos extratos e uma testemunha inoculada apenas com água) com 6 repetições para as características crescimento micelial e esporulação e 4

repetições para germinação de conídios e formação de apressórios. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P=0,05$) utilizando-se os procedimentos do programa ESTAT (1994). A média da testemunha foi comparada com as médias dos demais tratamentos pelo teste de Dunnett, utilizando-se o programa SAS (1993).

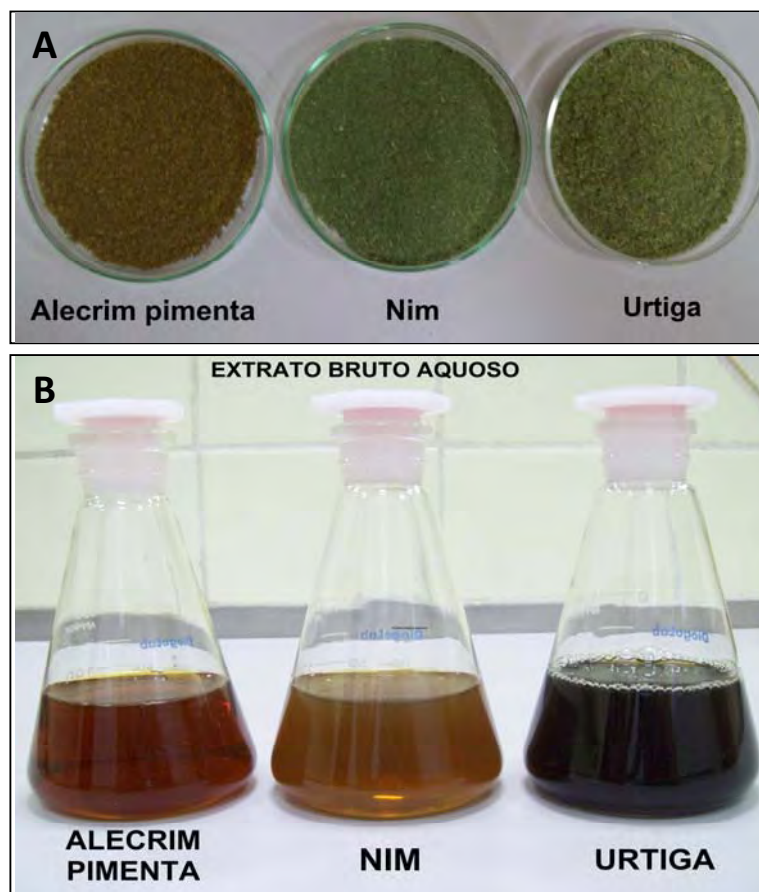


Figura 5 - Biomassa de folhas secas trituradas de alecrim pimenta, nim e urtiga (A), e seus extratos brutos aquosos prontos para utilização (B).

3.1.2.1. Efeito sobre o crescimento micelial e esporulação de *Colletotrichum gloeosporioides*

Para avaliar a ação dos extratos sobre o crescimento micelial de *C. gloeosporioides*, inicialmente preparou-se placas de Petri contendo o meio de cultura BDA (20 mL.placa^{-1}) associado aos Extratos Brutos Aquosos em três concentrações

(5%, 10% e 15%) e de uma testemunha. O meio de cultura foi preparado adicionando-se o produto comercial BDA-desidratado na proporção recomendada pelo fabricante (39 g.L⁻¹), diretamente às três concentrações dos EBAs e a água destilada para testemunha, sendo em seguida esterilizados por autoclavagem a 120 °C e 1 atm de pressão. Posteriormente, discos de micélio com 0,5 cm de diâmetro, do fungo *C. gloeosporioides* cultivado em BDA por 14 dias, foram transferidos para o centro das placas que foram em seguida mantidas a 28 ±1°C, sob luz fluorescente, com fotoperíodo de 12 horas. As avaliações foram realizadas obtendo-se o diâmetro das colônias através da média de duas medidas em sentidos perpendiculares entre si, para reduzir o efeito de deformação das colônias. As avaliações foram iniciadas um dia após a instalação do experimento e realizadas diariamente até que as maiores colônias fúngicas ultrapassassem 2/3 da superfície do meio de cultura (STANGARLIN et al., 1999), o que ocorreu com 5 dias de incubação.

A avaliação da ação dos extratos sobre a esporulação do fungo foi realizada imediatamente após o término da avaliação sobre o crescimento micelial. Para tanto, em cada placa utilizada no ensaio anterior, foram adicionados 20 mL de água destilada e, com o auxílio de um pincel de cerdas macias, procedeu-se a raspagem da superfície do meio de cultura para remoção dos esporos colocando-os em suspensão na água, filtrando-se em seguida, em tecido sintético, para retirada dos fragmentos de hifa. Para inibir a germinação dos conídios durante o período de leitura foi adicionado 5% de metanol e 3% de formol a 37% à água utilizada para preparar a suspensão. Em seguida, determinou-se a concentração de conídios (conídios.mL⁻¹) através da média de quatro contagens utilizando-se câmara de Neubauer, calculando-se, posteriormente, o número de conídios por cm⁻² de colônia para cada repetição dos tratamentos.

3.1.2.2. Efeito na germinação de conídios e formação de apressórios de *Colletotrichum gloeosporioides*

A partir de colônias esporuladas de *C. gloeosporioides* cultivadas em placas com meio BDA por 14 dias na temperatura de 28 ±1°C e em fotoperíodo de 12 h foram

preparadas suspensões de conídios utilizando-se os extratos brutos aquosos nas três concentrações (5%, 10% e 15%) e água destilada estéril para testemunha, ajustando-se a concentração para 10^4 conídios.mL⁻¹ com auxílio de uma câmara de Neubauer. A partir dessas suspensões, alíquotas de 20 µL foram espalhadas, com alça de Drigalsk, na superfície de lâminas de microscopia previamente preparadas com uma camada delgada de meio BDA acrescido dos extratos preparados como no ensaio anterior. Em seguida as lâminas foram colocadas em placas de Petri contendo algodão umedecido para manutenção da umidade (Figura 6) e mantidas na presença de luz na temperatura de $28 \pm 1^\circ\text{C}$. Após 12 h de incubação, a germinação dos esporos foi paralisada adicionando-se à superfície do meio de cultura uma gota de lactofenol de Amann e feita a contagem dos esporos germinados e não germinados. Foram considerados germinados os esporos com comprimento de tubo germinativo maior ou igual ao comprimento do esporo. Foram contados, no mínimo, 100 esporos para cada repetição dos tratamentos.

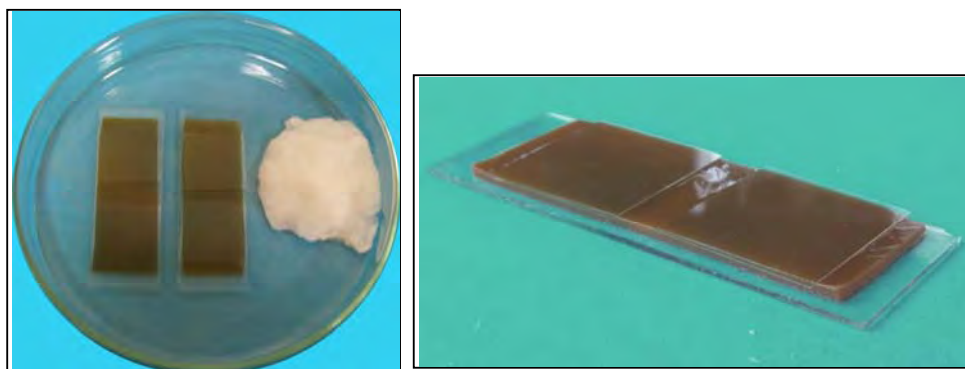


Figura 6 - Placas de Petri com lâminas, contendo meio de cultura associado aos tratamentos com extratos brutos aquosos de plantas, utilizadas para avaliação de germinação de conídios de *Colletotrichum gloeosporioides*.

Utilizando-se as mesmas suspensões de conídios preparadas no ensaio anterior foram depositados 20 µL de cada suspensão na superfície de lâminas de microscopia cobrindo-se em seguida com lamínula. As lâminas foram acondicionadas nas mesmas

condições do ensaio anterior e após 12 horas de incubação, na presença de luz e em temperatura de $28 \pm 1^\circ\text{C}$, procedeu-se a determinação do percentual de apressórios formados em relação aos conídios germinados.

3.2. Avaliação do potencial dos extratos brutos aquosos de plantas para indução de fitoalexinas

3.2.1. Determinação das testemunhas positivas para os ensaios com mesocótilo de sorgo e cotilédones de soja

As testemunhas positivas para os ensaios com mesocótilos de sorgo e cotilédones de soja foram determinadas avaliando-se seis tratamentos. Os tratamentos para o ensaio com mesocótilos de sorgo foram: suspensão de *Saccharomyces cerevisiae* a 15% + Carborundum; Carborundum; suspensão de conídios de *Colletotrichum gloeosporioides* (10^5 conídios.mL⁻¹) + Carborundum; suspensão de *Saccharomyces cerevisiae* a 15%; suspensão de conídios de *Colletotrichum gloeosporioides* (10^5 conídios.mL⁻¹); Água destilada esteril, e foi utilizada a mesma metodologia descrita no item 3.2.2. Para o ensaio com cotilédones de soja empregou-se os tratamentos: suspensão de *Saccharomyces cerevisiae* a 15%; suspensão de conídios vivos de *Colletotrichum truncatum* (10^5 conídios.mL⁻¹); suspensão de conídios vivos de *Colletotrichum gloeosporioides* (10^5 conídios.mL⁻¹); suspensão autoclavada de conídios de *C. truncatum* (10^5 conídios.mL⁻¹); suspensão autoclavada de conídios de *C. gloeosporioides* (10^5 conídios.mL⁻¹); Água destilada estéril, sendo utilizada a mesma metodologia descrita no item 3.2.3.

3.2.2. Produção de fitoalexinas em mesocótilos estiolados de sorgo

Este ensaio foi realizado utilizando-se sementes de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) cultivar BRS 420. Inicialmente, as sementes foram desinfestadas em hipoclorito de sódio a 1% durante 10 minutos, em seguida lavadas em água destilada

estéril por três vezes consecutivas. Após a desinfestação, 8 sementes foram distribuídas, em linha, sobre duas camadas de papel de germinação cortado em tiras com 6 cm de largura e umedecidas com água destilada estéril. Em seguida foram cobertas com uma terceira tira de papel e enroladas formando pequenos cartuchos que foram colocados em posição vertical com a extremidade inferior dentro de um recipiente contendo água destilada estéril para manter a umidade do papel durante o período de germinação. Assim preparados, os cartuchos com as sementes foram incubados em câmara úmida na ausência de luz a $28 \pm 1^\circ\text{C}$ por cinco dias. As plântulas formadas foram expostas a luz por 4 horas para paralisar a elongação dos mesocótilos (YAMAOKA et al., 1990). Desta maneira, foram obtidas plântulas com mesocótilos uniformemente alongados e adequados para o bioensaio de produção de fitoalexinas.

Para o teste de avaliação do potencial elicitor de fitoalexinas dos EBAs de alecrim pimenta, nim e urtiga os mesocótilos foram pulverizados com 2 mL dos extratos nas concentrações de 5%, 10% e 15%. Neste ensaio foram utilizadas duas testemunhas. Para a testemunha negativa utilizou-se 2 mL de água destilada estéril e para testemunha positiva 2 mL de uma suspensão de *Saccharomyces cerevisiae* (Fermento Fleischmann Roial® fresco) na concentração de 15% (produto comercial/água) após tratamento por fricção com carborundum (definida em ensaio preliminar com seis tratamentos). Os mesocótilos foram mantidos em câmara úmida, a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ sob luz fluorescente por um período de 60 horas. Após esse período 3 mesocótilos por repetição foram cortados e uma porção de três cm pesada, cortada em pequenos segmentos e colocados em tubos de ensaios contendo 1,4 mL de metanol 80% acidificado (0,1% HCl; v/v) (STANGARLIN et al., 1999). Os segmentos fragmentados dos mesocótilos foram mantidos a 4°C em metanol por 96 horas para extração dos pigmentos, e a absorbância foi determinada a 480 nm (WULFF & PASCHOLATI, 1998). Os dados foram expressos em absorbância a 480 nm por grama de tecido fresco ($\text{Abs (480 nm).g.t.f.}^{-1}$). As etapas do bioensaio são apresentadas na Figura 7.

O ensaio foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial $3 \times 3 + 2$ (3 EBAs, 3 concentrações e duas testemunhas, uma negativa e outra

positiva) com cinco repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P=0,05$) utilizando-se os procedimentos do programa ESTAT (1994). As médias das testemunhas foram comparadas com as dos demais tratamentos pelo teste de Dunnett, utilizando-se o programa SAS (1993).

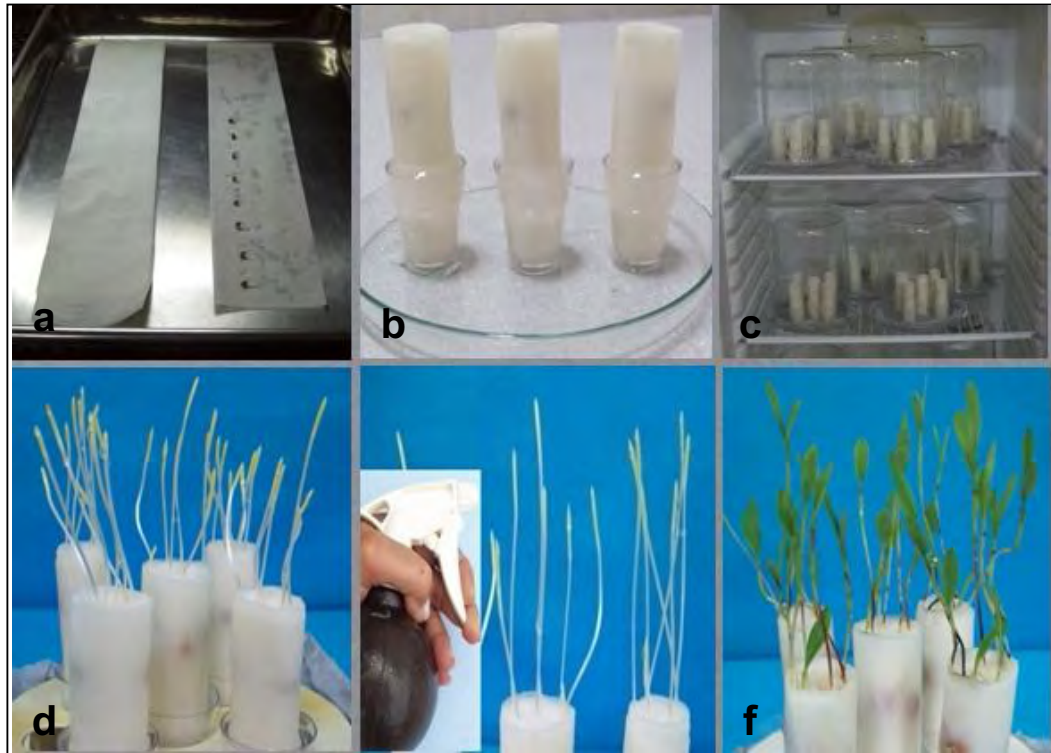


Figura 7 - Sequência de etapas do bioensaio para indução de fitoalexinas em hipocótilos estiolados de sorgo: sementes distribuídas em papel de germinação (a), enroladas em cartuchos (b), e incubadas (c), hipocótilos estiolados (d), pulverizados com os extratos vegetais (e) e fitoalexinas sintetizadas (f).

3.2.3. Produção de fitoalexinas em cotilédones de soja

Para realização deste ensaio foram utilizadas sementes de soja, (*Glycine max* L.) esterilizada utilizando bandejas plásticas em condições de casa de vegetação. Dez dias

após, com as plântulas apresentando média de 10 cm de altura, os cotilédones foram destacados dos hipocótilos das plântulas, lavados em água destilada estéril, enxugados; cortados em secção aproximada de 1 mm de espessura a partir da superfície inferior e posteriormente as secções foram pesadas. Assim preparados, cinco cotilédones foram colocados em placa de Petri com papel de filtro umedecido com água destilada estéril. Sobre cada cotilédone foi aplicada uma alíquota de 20 µL dos Extratos Brutos Aquosos (EBAs) de alecrim pimenta, nim e urtiga nas 3 concentrações de 5%; 10% e 15%. Para os tratamentos testemunhas utilizaram-se 2 µL de água destilada estéril para testemunha negativa e 2 µL de uma suspensão a 15% de *S. cerevisiae* para testemunha positiva (definida em ensaio preliminar com seis tratamentos). As placas contendo os cotilédones foram mantidas a 25 °C e no escuro por 20 h e em seguida esses foram transferidos para tubos de ensaio contendo 15 ml de água destilada estéril e deixados em agitação por 1 h para extração da fitoalexina formada. A absorbância foi determinada a 285 nm (AYERS et al., 1976). Os dados foram expressos em absorbância a 285 nm por grama de tecido fresco (Abs (285 nm).g.t.f.⁻¹).

O ensaio foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 x 3 + 2 (3 EBAs, 3 concentrações e duas testemunhas, (uma negativa e outra positiva) com cinco repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey (P=0,05) utilizando-se os procedimentos do programa ESTAT (1994). As médias das testemunhas foram comparadas com as dos demais tratamentos pelo teste de Dunnett, utilizando-se o programa SAS (1993).

3.3. Controle da antracnose em folhas de cajueiro

Na avaliação do comportamento dos EBAs de alecrim pimenta, nim e urtiga sobre o controle da antracnose em folhas de cajueiro, foi empregada a técnica de folhas destacadas (MENDES & BERGAMIN FILHO, 1986). Para a inoculação, folhas no primeiro estágio vegetativo foram previamente selecionadas de uma mesma planta de cajueiro anão-precoce clone CCP 76.

As folhas foram destacadas mediante o corte com bisturi na base do pecíolo, no dia anterior a inoculação. Imediatamente após o corte as folhas tiveram o pecíolo envolvido por algodão umedecido em água destilada estéril e foram acondicionadas em placas de Petri (150 x 20 mm) esterilizadas contendo uma fina camada de algodão coberta por um disco de papel de filtro e umedecidos com água destilada estéril. As folhas foram pulverizadas com os EBAs de alecrim pimenta, nim e urtiga nas três concentrações de 5%, 10% e 15% e água destilada estéril como testemunha. A inoculação foi realizada 24 horas após a pulverização depositando, em quatro pontos da face ventral das folhas, uma alíquota de 20 µL de uma suspensão de conídios de *C. gloeosporioides* na concentração de 10^4 conídios.mL⁻¹. Após a inoculação das folhas as placas foram fechadas com filme plástico transparente para manter a umidade elevada e incubadas à temperatura ajustada para 28°C ±1°C e fotoperíodo de 12 horas. Após 48 horas o filme plástico foi retirado e as folhas mantidas nessas condições até serem avaliadas seis dias depois de inoculadas. A avaliação foi realizada medindo-se o diâmetro das lesões necróticas formadas em torno do ponto de inoculação.

O ensaio foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 x 3 + 2 (3 EBAs, 3 concentrações e duas testemunhas, uma inoculada e outra não inoculada), com cinco repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey (P=0,05) utilizando-se os procedimentos do programa ESTAT (1994). As médias das testemunhas foram comparadas com as dos demais tratamentos pelo teste de Dunnett, utilizando-se o programa SAS (1993).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica dos extratos brutos aquosos de plantas

4.1.1. Efeito sobre o crescimento micelial e esporulação de *Colletotrichum gloeosporioides*

O crescimento micelial de *C. gloeosporioides* sofreu efeito inibitório no diâmetro máximo das colônias de acordo com o extrato e concentração empregada (Tabela 1). Com exceção do extrato aquoso de urtiga, nos demais tratamentos observou-se inibição do diâmetro das colônias em relação à testemunha. Empregando-se o extrato de alecrim pimenta, nas concentrações 10% e 15% não foi observado crescimento micelial. Por outro lado, o extrato de urtiga estimulou o crescimento do fungo proporcionando diâmetro final das colônias maior que o tratamento controle nas três concentrações estudadas (Figura 8).

Tabela 1 - Efeito de diferentes concentrações do extrato bruto aquoso (EBA) de alecrim pimenta, nim e urtiga no diâmetro de colônia, de *Colletotrichum gloeosporioides*.

EBA	Concentração			Testemunha
	5%	10%	15%	
	Diâmetro de colônias em mm ¹			
Alecrim pimenta	12 aC*	0 bC*	0 bC*	
Nim	50 aB*	43 bB*	38 cB*	58
Urtiga	70 bA*	73 aA*	71 abA*	
CV(%)		4,59		4,59

¹Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

*Médias que diferem da testemunha pelo teste de Dunnett, ao nível de 5% de probabilidade

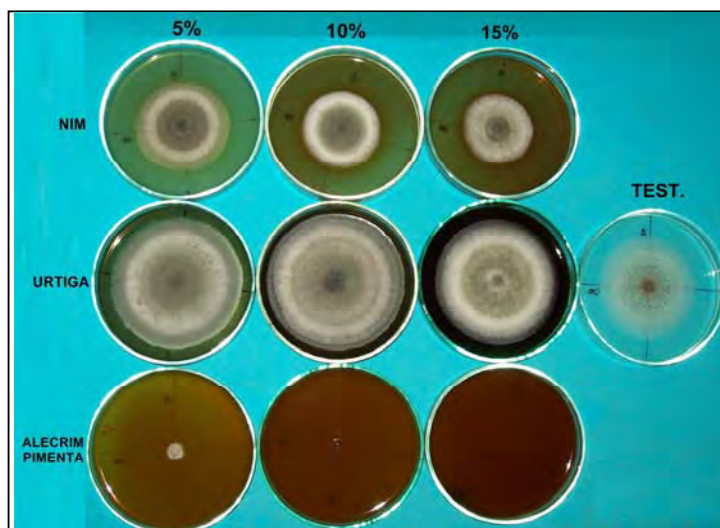


Figura 8 - Desenvolvimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* em meio de cultura BDA associado aos extratos brutos de plantas.

Referendando os dados aqui obtidos, a inibição do crescimento micelial de espécies do gênero *Colletotrichum*, pela ação de extrato bruto ou óleos essenciais de plantas medicinais, encontra-se documentada em vários trabalhos, com percentual de redução do crescimento micelial variável com a planta e concentração do extrato, como a redução de 42% com extrato de alho a 0,1% em *C. lindemutianum* (BIANCHI et al., 1997), 67% com o mesmo extrato a 1% em *C. gloeosporioides* (RIBEIRO & BEDENDO, 1999); 74,45% com extrato cítrico a 1% (MOTOYAMA et al., 2003) e 18% com extrato hexânico de copaiba a 0,8% em *C. gloeosporioides* (AMORIM et al., 2004). *Colletotrichum gloeosporioides* foi também avaliado em relação ao efeito do extrato bruto e da tintura de alecrim pimenta (*Lippia sidoides*) sobre o crescimento micelial *in vitro* e os resultados mostraram redução no diâmetro das colônias de até 96,8% além de deformações celulares e/ou micelial quando utilizado o extrato bruto (OLIVEIRA et al., 1998) e de 97,7% utilizando a tintura (PESSOA et al., 1996). BONALDO et al. (2007) avaliaram o efeito de diferentes concentrações do extrato bruto de *Corymbia citriodora* sobre *Colletotrichum sublineolum* e observaram inibição de 80% no crescimento micelial quando utilizaram a concentração de 25%. Para fungos de outros

gêneros como *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, contaminantes na micropropagação de plantas, OLIVEIRA et al. (2008) também relataram inibição superior a 90% no crescimento micelial utilizando óleo essencial de *L. sidoides* na concentração de 0,3 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ enquanto NIAZ et al. (2008), empregando óleo essencial de nim, constataram também reduções significativas diretamente proporcional à dosagem utilizada no crescimento micelial de quatro espécies de *Drechslera*. A redução do crescimento micelial decorre da ação fungitóxica das substâncias com efeito antimicrobiano presentes na composição das plantas bioativas, no entanto se o extrato não manifestar efeito fungitóxico sua composição em carboidratos, proteínas e outras substâncias importantes no metabolismo do fungo enriquecerão a composição nutritiva do meio de cultura produzindo o efeito inverso o que pode explicar o efeito observado com o extrato de urtiga.

Os dados referentes aos efeitos dos extratos nas três concentrações sobre a esporulação de *C. gloeosporioides* encontram-se na (Tabela 2). Observando-se esses dados verificou-se que entre os extratos estudados o EBA de alecrim pimenta, nas três concentrações, proporcionou o maior efeito inibidor impedindo totalmente a esporulação

Tabela 2 - Efeito de diferentes concentrações do extrato bruto aquoso (EBA) de alecrim pimenta, nim e urtiga na esporulação de *Colletotrichum gloeosporioides*.

EBA	Concentração			Testemunha
	5%	10%	15%	
	conídios.cm ⁻² de colônia (x10 ³) ¹			
Alecrim pimenta	0,0 *	0,0 *	0,0 *	
Nim	11,8 bA*	19,5 aA*	22,7 aA	27
Urtiga	12,6 aA*	10,1 aB*	9,1 aB*	
CV(%)		25,01		30,02

¹ Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

*Médias que diferem da testemunha pelo teste de Dunnett, ao nível de 5% de probabilidade

de *C. gloeosporioides*, dado que reflete o resultado obtido sobre o crescimento micelial já que não houve formação de micélio nas duas maiores concentrações e muito pequena a 5%. O extrato de urtiga inibiu parcialmente a esporulação sem diferenças significativas entre as concentrações. Por outro lado, o extrato de nim apresentou efeito de inibição parcial da esporulação somente nas concentrações de 5% e 10%. Os dados obtidos estão de acordo com os relatados por RIBEIRO & BEDENDO (1999) que, empregando extratos aquosos de hortelã, mamona e pimenta, nas concentrações de 200 a 10.000 mg.L⁻¹, constataram inibição na produção de conídios de *C. gloeosporioides* em níveis variáveis de 41% a 84%, de acordo com as concentrações crescentes dos mesmos. Também CARRÉ et al. (2006), em ensaio para avaliar o crescimento micelial e a esporulação *in vitro* do fungo *Colletotrichum musae* na presença de extratos da planta *Artemisia camphorata* (cânfora), constataram inibição da esporulação em 86% na concentração de 25%. Outros fungos tiveram a esporulação *in vitro* inibida sob o efeito de extratos de plantas, como *Alternaria solani* que na presença de extrato autoclavado de cúrcuma (*Curcuma longa*) na concentração de 20% teve a esporulação inibida em 78,6% (BALBI-PEÑA et al., 2006).

4.1.2. Efeito na germinação de conídios e formação de apressórios de *Colletotrichum gloeosporioides*

Na Tabela 3, verifica-se que os conídios de *C. gloeosporioides* não germinaram quando colocados na presença do EBA de alecrim pimenta nas concentrações de 5%, 10% e 15% e do EBA de urtiga nas concentrações de 10% e 15%. Por outro lado, empregando-se extrato de nim verificou-se germinação dos conídios nas três concentrações testadas com decréscimos significativos nos percentuais de germinação em função do aumento da concentração, contudo os esporos germinados sob a ação dos EBAs de urtiga e nim apresentavam acentuadas deformações no tubo germinativo dos conídios as quais se intensificavam com o aumento da concentração. Foram constatadas, nos tubos germinativos, reduções no comprimento, aumento de diâmetro e alteração de formato (Figura 9). Quanto à

formação de apressórios os três extratos exerceram ação inibidora significativa impedindo totalmente a formação sendo observado apressórios somente no tratamento testemunha em 24,7% dos conídios germinados (Figura 10).

Tabela 3 - Efeito de diferentes concentrações de extrato bruto aquoso (EBA) de alecrim pimenta, nim e urtiga na germinação de conídios de *Colletotrichum gloeosporioides*.

EBA	Concentração			Testemunha
	5%	10%	15%	
	% de germinação de conídios ¹			
Alecrim pimenta	0,0 *	0,0 *	0,0 *	
Nim	78,1 aB*	70,2 bA*	14,8 cA*	97,6
Urtiga	90,4 aA*	0,0 bB*	0,0 bB*	
CV(%)	4,33			5,17

¹ Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

*Médias que diferem da testemunha pelo teste de Dunnett, ao nível de 5% de probabilidade

Inibição na germinação de conídios e a ocorrência de deformações no tubo germinativo em virtude da ação de extratos de plantas encontram-se relatadas em vários trabalhos. BONALDO et al. (2004), ao avaliarem extrato aquoso autoclavado de *Corymbia citriodora* sobre germinação de conídios de *Colletotrichum lagenarium*, verificaram que em concentrações acima de 5% de folhas frescas (p/v) ocorreu inibição de 90% na germinação e ao empregar extrato na concentração de 25% o percentual de inibição atingiu 100%. Foi relatado também pelos autores a ocorrência de deformação na morfologia do tubo germinativo dos conídios germinados, efeito que se acentuou com o aumento da concentração. MOTOYAMA et al. (2003) avaliaram o efeito do extrato cítrico em concentrações crescentes de um a 5000 mg.L⁻¹ sobre o fungo *Colletotrichum lagenarium* e os resultados permitem observar que houve inibição da germinação dos conídios diante do aumento das concentrações de extrato cítrico, atingindo 100% de inibição na concentração de 5.000 mg.L⁻¹. SOUZA et al. (2007)

também observaram decréscimos nos percentuais de germinação dos esporos de *Fusarium proliferatum* em função do aumento da concentração dos extratos de alho e

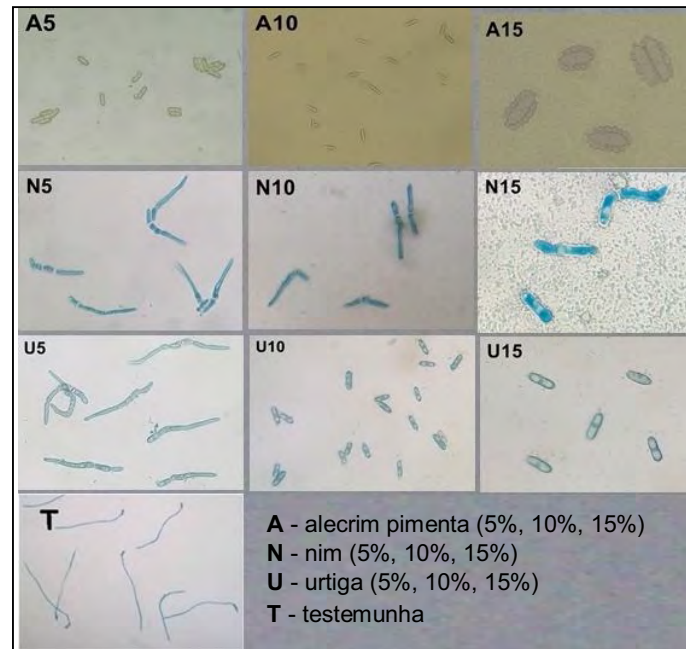


Figura 9 - Efeito dos Extratos brutos aquosos das plantas estudadas sobre a germinação de esporos de *Colletotrichum gloeosporioides* em meio de cultura BDA, apresentando deformações no tubo germinativo.

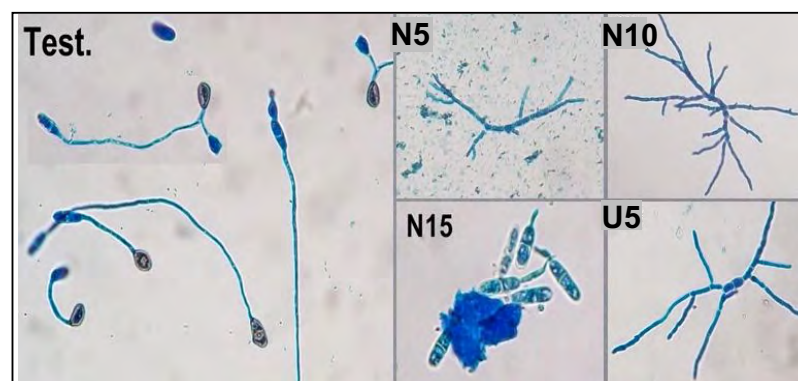


Figura 10 - Efeito dos Extratos brutos aquosos das plantas estudadas sobre a formação de apressórios de *Colletotrichum gloeosporioides*. Test.=testemunha; N=nim (5%, 10%, 15%); U=urtiga (5%).

capim santo. Na concentração de 10% constataram inibição de 90% e 81% para os dois extratos, respectivamente. BONALDO et al. (2007), ao avaliarem óleo essencial de *Corymbia citriodora* em diferentes dosagens (5 a 60 µL), relataram inibição de 100% na germinação e formação de apressórios de *C. sublineolum* para todas as dosagens testadas.

A atividade antifúngica dos extratos vegetais decorre de substâncias com ação fungitóxicas ou fungistáticas presentes na composição do órgão ou da planta utilizada, onde grande diversidade de metabólitos secundários, muitos com atividade antifúngica são sintetizados (SCHWAN-ESTRADA et al., 2000). Dentre esses compostos, QUIROGA et al. (2001) citam flavonóides, fenóis e glicosídeos fenólicos, lactonas não saturadas, compostos de enxofre, saponinas, heterosídeos cianogênicos e glucosinolatos. Além destes, uma mistura natural de monoterpenos, diterpenos e hidrocarbonetos com uma variedade de grupos funcionais apresentam ação antifúngica (DAFERERA et al., 2000). Segundo FONTENELLE et al. (2007) os principais constituintes de óleos essenciais extraídos de plantas que exercem atividade antifúngica importante são compostos fenólicos como o timol, carvacrol ou eugenol de comprovada atividade antimicrobiana. O alecrim pimenta segundo, COSTA et al. (2001) apresenta timol e carvacrol como principais constituintes do óleo essencial das folhas com teores de timol variando de 43,5% a 59,5% (COSTA et al., 2005; FONTENELLE et al., 2007) representando 1,5% da matéria seca de folhas (NUNES et al., 2005). A forte ação antifúngica exercida pelo alecrim pimenta sobre as características culturais avaliadas de *C. gloeosporioides* provavelmente decorreu da presença dessas substâncias. Em nim, a principal substância bioativa estudada, e que pode estar envolvida na ação antifúngica, é a azadiractina, um triterpeno oxigenado presente nas folhas, frutos e sementes (NEVES et al., 2003). As folhas de urtiga, embora pouco estudadas em relação à sua ação antifúngica, contêm grandes quantidades de ácido clorogênico e 2-ocaffeoylmalic que representam, respectivamente, 71,5 e 76,5% do total de compostos fenólicos presentes (PINELLI et al., 2008).

4.2. Avaliação do potencial dos extratos brutos aquosos de plantas para indução de fitoalexinas

4.2.1. Determinação das testemunhas positivas para os ensaios com mesocótilo de sorgo e cotilédones de soja

Os resultados são apresentados na figura 11. Os dados mostraram os tratamentos suspensão de *Saccharomyces cerevisiae* a 15% + Carborundum; e suspensão de *Saccharomyces cerevisiae* a 15% para serem utilizados como testemunha positiva nos ensaios de indução de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo e cotilédones de soja, respectivamente.

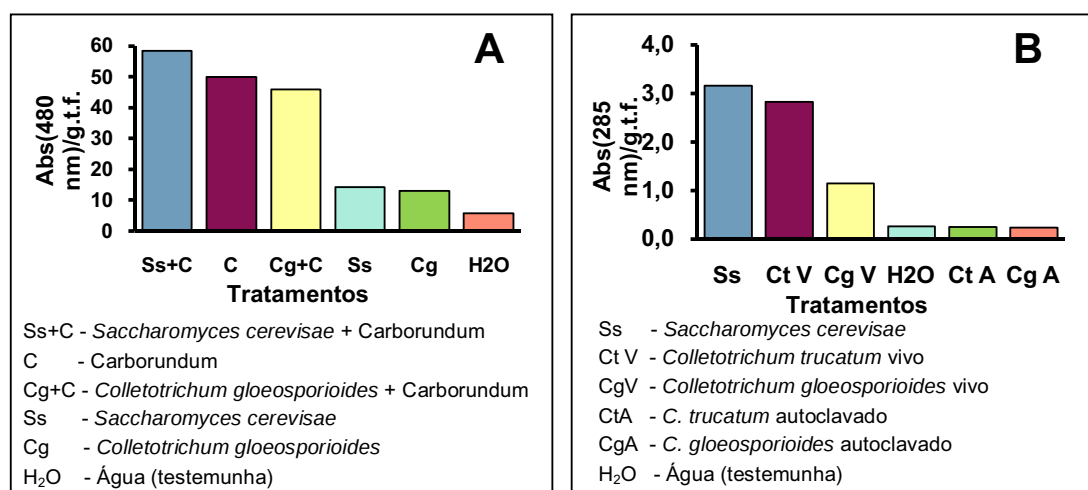


Figura 11 - Resultados de testes preliminares para definição das testemunhas positivas nos ensaios com indução de fitoalexina em hipocótilos de sorgo (A) e cotilédones de soja (B).

4.2.2. Produção de fitoalexinas em mesocótilos estiolados de sorgo

O extrato de alecrim pimenta, na concentração de 15%, promoveu acúmulo significativo dos pigmentos que caracterizam as fitoalexinas do tipo deoxiantocianidinas em mesocótilos de sorgo (Figura 12 e 13), enquanto que os demais tratamentos não diferiram significativamente da testemunha negativa (Tabela 4). Estes dados mostram

que os EBAs de nim e urtiga, nas concentrações estudadas, não apresentam potencial elicitador de fitoalexinas quando utilizada a metodologia do hipocótilo estiolado de sorgo. Ao contrário, o EBA de alecrim pimenta em concentração de 15% demonstrou potencial elicitador da fitoalexina deoxiantocianidinas. HIPSKIND et al. (1990) e LO et al. (1996) relataram que plântulas de sorgo produzem compostos fenólicos em resposta à inoculação com fungos patogênicos ou não, identificados como fitoalexinas do grupo deoxiantocianidinas.

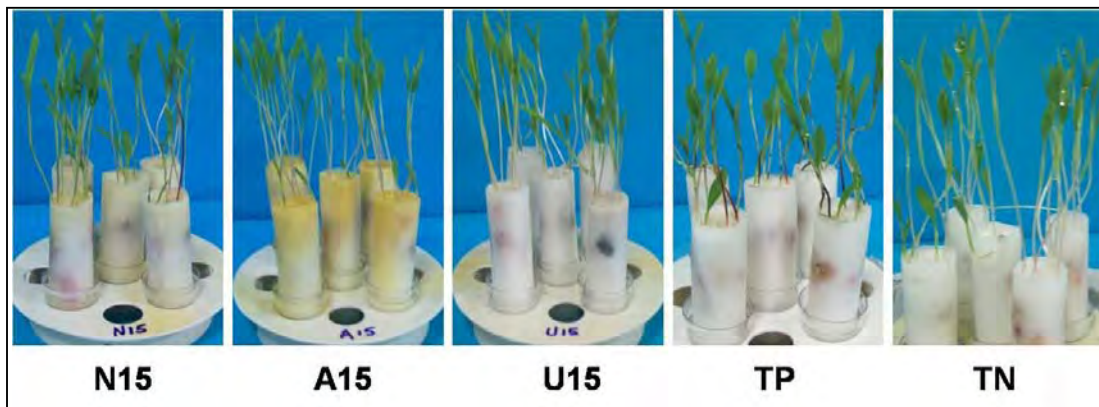


Figura 12 - Efeito dos Extratos brutos aquosos: nim 15% (N15), alecrim pimenta 15% (A15), urtiga 15% (U15) e das testemunhas: positiva (TP) e negativa (TN) sobre a indução de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo.

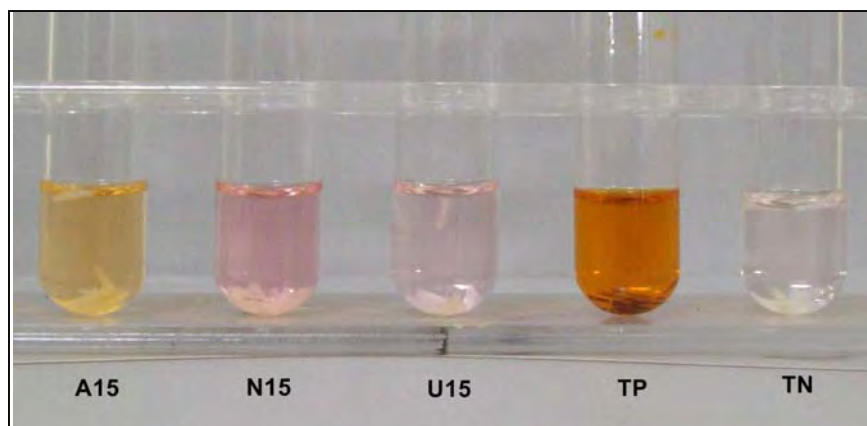


Figura 13 - Fitoalexinas deoxiantocianidinas extraídas de mesocótilos de sorgo tratados com extratos brutos aquosos de Alecrim pimenta (A); Nim (N); urtiga (U) e das Testemunhas positiva (TP) e negativa (TN). A pigmentação indica o teor de fitoalexina sintetizada.

Os dados obtidos estão de acordo com estudos realizados por STANGARLIN et al. (1999). Os autores estudaram o potencial elicitor de deoxiantocianidinas, em mesocótilos estiolados de sorgo, do extrato bruto de 15 plantas medicinais e os resultados demonstraram grande variação na capacidade elicitora entre as plantas testadas, sendo mais efetivos os extratos brutos de romã, erva cidreira, manjerona, babosa e orégano. Ainda segundo os autores a maior indução foi observada pelo tratamento com o patógeno *C. graminicola*, onde, provavelmente, se observa maior nível de reconhecimento e, portanto, maior ativação do metabolismo de defesa da planta. BONALDO et al. (2004) ao avaliarem a capacidade elicitora de fitoalexina do extrato aquoso de *Corymbia citriodora* também constataram acúmulo da fitoalexina deoxiantocianidina quando utilizaram concentrações elevadas (10% a 25%). Em baixa concentração (0,1%) não houve acúmulo da fitoalexina. Por outro lado, MOTOYAMA et al. (2003) relataram a formação de deoxiantocianidinas em mesocótilos de sorgo tratados com extrato cítrico em todas as concentrações estudadas entre 10 e 5.000 mg. L⁻¹.

Tabela 4. Produção das fitoalexinas deoxiantocianidinas em mesocótilos de sorgo após o tratamento com diferentes concentrações dos extratos brutos aquosos (EBA) de alecrim pimenta, nim e urtiga.

EBA	Concentração			Testemunha	
	5%	10%	15%	Negativa	Positiva
Abs(480 nm)/g.t.f. ^{1 2}					
Alecrim pimenta	2,3 aA *	4,6 aA *	6,7 aA *•		
Nim	2,9 aA *	4,5 aA *	4,0 aA *	1,7	74,9
Urtiga	1,6 aA *	3,2 aA *	4,0 aA *		
CV(%) =		31,45		32,30	29,91

¹ Absorbância a 480 nm por grama de tecido fresco.

² Médias seguidas de mesa letra minúscula na linha e maiúscula coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

* Médias que diferem da testemunha positiva pelo teste de Dunnett, ao nível de 5% de probabilidade

• Médias que diferem da testemunha negativa pelo teste de Dunnett, ao nível de 5% de probabilidade

4.2.3. Produção de fitoalexinas em cotilédones de soja

Os resultados do ensaio para produção da fitoalexina gliceolina em cotilédones de soja, são mostrados na Tabela 5. Os dados mostram que todos os tratamentos diferiram da testemunha negativa e, portanto, induziram a síntese de gliceolina em cotilédones de soja. Pode ser observado, porém, que a capacidade elicitora foi bastante variável tanto entre os EBAs como entre as concentrações (Figura 14).

Quando avaliados os EBAs, observou-se que alecrim pimenta apresenta a maior capacidade elicitora da fitoalexina em todas as concentrações, além de ser o único extrato a superar significativamente a testemunha positiva o que ocorreu na concentração de 15%. Por outro lado, quando analisada a variável concentração, observa-se que os extratos mantêm a tendência esperada de aumento da indução da fitoalexina com o aumento da concentração. Nim a 5% demonstrou o menor potencial elicitor de fitoalexina quando utilizada a metodologia com cotilédones de soja.

Tabela 5. Produção da fitoalexina gliceolina em cotilédones de soja, após o tratamento com diferentes concentrações dos extratos brutos aquosos de alecrim pimenta, nim e urtiga.

Plantas	Concentração			Testemunha	
	5%	10%	15%	Negativa	Positiva
Abs(285 nm)/g.t.f. ^{1 2}					
Alecrim pimenta	1,45 cA**	2,64 bA**	3,91 aA**		
Nim	0,59 bC**	1,44 aB**	1,51 aC**	0,26	3,17
Urtiga	0,98 cB**	1,43 bB**	1,79 aB**		
CV(%)		7,21		7,55	7,55

¹ Absorbância a 285 nm por grama de tecido fresco.

² Médias seguidas de mesa letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

* Médias que diferem da testemunha positiva pelo teste de Dunnett, ao nível de 5% de probabilidade

• Médias que diferem da testemunha negativa pelo teste de Dunnett, ao nível de 5% de probabilidade

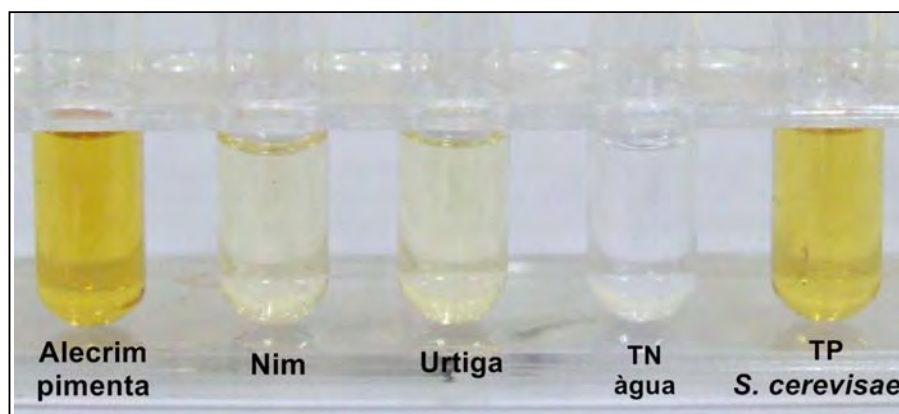


Figura 14 - Fitoalexina gliceolina extraídas de cotilédones de soja tratados com extratos brutos aquosos a 15%. A pigmentação indica o teor de fitoalexina sintetizada. (TN = Testemunha negativa; TP = testemunha positiva)

Em trabalho semelhante, STANGARLIN et al. (1999), avaliaram o potencial elicitor da fitoalexina gliceolina, pelo extrato das mesmas 15 plantas medicinais e os resultados também estão de acordo com os dados aqui obtidos, mostrando grande variação na capacidade elicitora de gliceolina entre as plantas testadas, sendo os extratos brutos de pitanga, cânfora, poejo, romã e cardo santo os mais efetivos, entre as plantas medicinais testadas, em induzir o acúmulo de gliceolina em cotilédones de soja. Estudando o extrato bruto de alfavaca-cravo (*Ocimum gratissimum*) e suas frações sobre a produção de fitoalexinas, COLPAS, et al. (2009) verificaram que os extratos brutos estimularam a produção de gliceolina em soja atingindo picos de produção na concentração de 30%. MAZARO et al. (2008) avaliaram o potencial da planta *Eugenia uniflora* L. (pitangueira) em induzir fitoalexinas em cotilédones de soja nas formas de extrato alcoólico, infusão, maceração e decocção, obtidos de folhas em quatro concentrações além do óleo essencial. Os preparados apresentaram capacidade de indução das fitoalexinas gliceolinas em cotilédones de soja, respondendo ao aumento das concentrações. O óleo essencial destacou-se, chegando a induzir duas vezes mais gliceolina do que a testemunha de referência e segundo BONALDO et al. (2004) o extrato aquoso autoclavado de *Corymbia citriodora* induziu a síntese de gliceolina, em

cotilédones de soja a partir da concentração de 10%, enquanto que o extrato aquoso não autoclavado, induziu a partir da concentração de 15% de extrato.

4.3. Controle da antracnose em folhas de cajueiro

O surgimento dos primeiros sintomas teve início aos três dias após a inoculação, na testemunha inoculada. A leitura final foi realizada com seis dias e os sintomas formados se caracterizavam como lesões necróticas de forma circular em torno do ponto de inoculação, e coloração marrom escuro (Figura 15). Os dados são apresentados na Tabela 6. Analisando-se essa tabela observou-se que, em folhas destacadas, os EBAs de alecrim pimenta e nim apresentaram valores do diâmetro das lesões significativamente menor do que a testemunha inoculada independente da concentração com redução de 72% em nim a 5% a 84% em alecrim pimenta a 15%, o que em urtiga só foi observado na maior concentração com redução de 35%, mostrando efeito de controle da doença com estes tratamentos.

Tabela 6 - Severidade da antracnose em folhas destacadas de cajueiro tratadas com diferentes concentrações do EBA de alecrim pimenta, nim e urtiga.

Plantas	Concentração			Testemunha	
	5%	10%	15%	Inoculada	Não Inoculada
Diâmetro das lesões em mm ¹					
Alecrim pimenta	2,8 aB*•	2,8 aB*•	2,2 aB*•		
Nim	3,8 aB*•	3,4 aB*•	2,9 aB*•	14,0	0,0
Urtiga	13,2 aA•	11,8 aA•	9,2 bA*•		
CV(%)	19,27			19,31	19,31

¹ Médias seguidas de mesa letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

* Médias que diferem da testemunha inoculada pelo teste de Dunnett, ao nível de 5% de probabilidade

• Médias que diferem da testemunha não inoculada pelo teste de Dunnett, ao nível de 5% de probabilidade

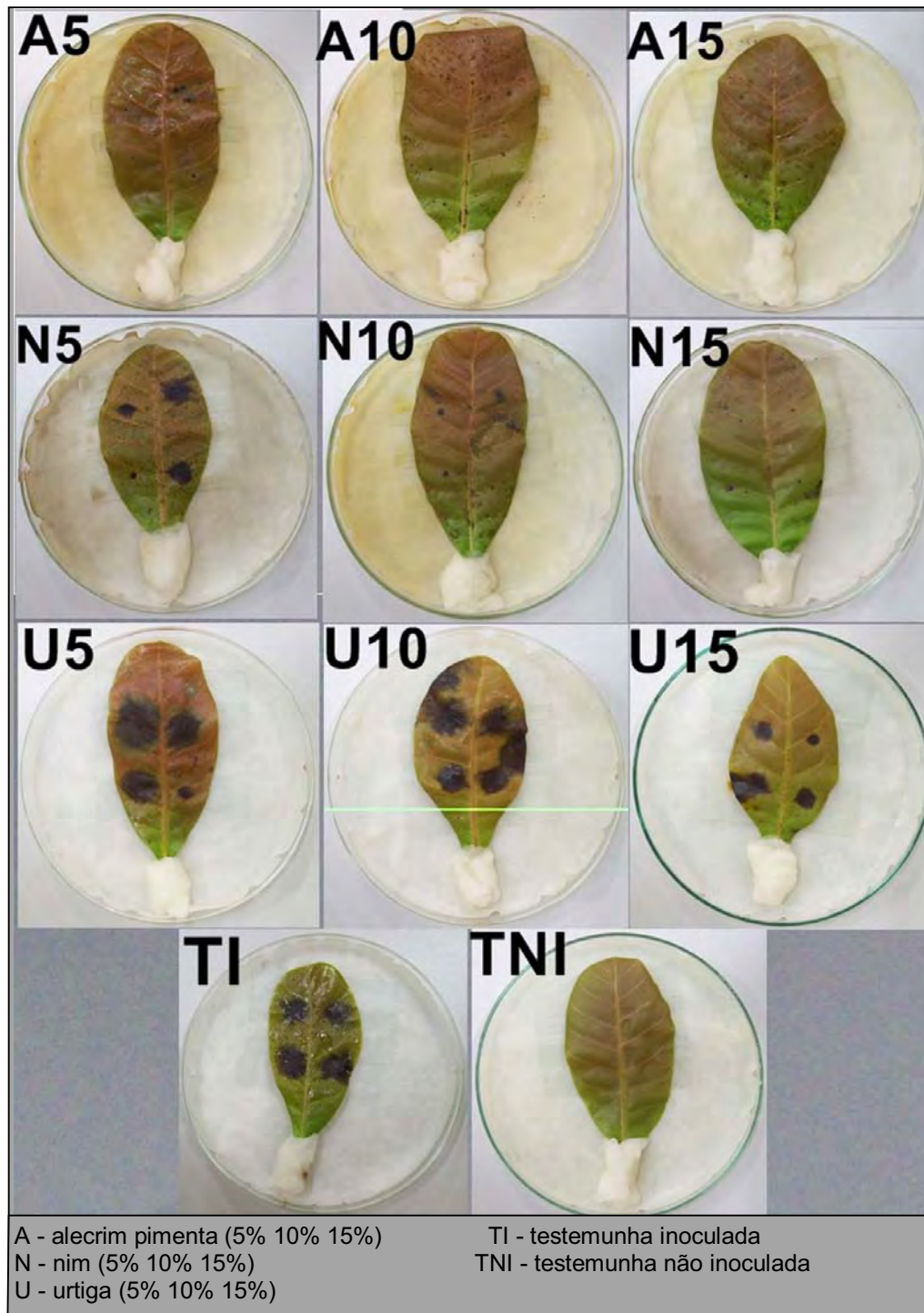


Figura 15 - Reação de folhas de cajueiro destacadas, pulverizadas com os Extratos brutos aquosos, à inoculação com *Colletotricum gloeosporioides* agente da antracnose do cajueiro.

As reduções, observadas na severidade da antracnose nas folhas do cajueiro, podem ter ocorrido em decorrência da atividade antifúngica dos extratos demonstrada nos ensaios com inibição micelial, germinação de conídios e formação de apressórios, como, também, pela indução de fitoalexinas expressada, nos experimentos com hipocótilos de sorgo e cotilédones de soja. Entretanto, não se descarta a possibilidade de também estar ocorrendo a indução de outros fatores que conferem resistência induzida.

O controle de doenças com extratos de plantas já foi demonstrado em vários outros patossistemas. Como exemplos, SALGADO-GARCIGLIA et al. (2008) avaliaram o efeito do extrato bruto e mistura de compostos bioativos obtidos da raiz de *Heliopsis longipes* no controle da antracnose do feijoeiro (*Colletotrichum lindemuthianum*) em casa de vegetação e campo. Os resultados mostraram redução na incidência da antracnose de 90% em casa de vegetação e de 88% em campo, não afetando significativamente o peso seco das plantas tratadas. ITAKO et al. (2008) avaliaram o efeito protetor dos extratos brutos aquosos (EBAs) das plantas medicinais *Achillea millefolium* (mil-folhas), *Artemisia camphorata* (canfora), *Cymbopogon citratus* (capim-limão) e *Rosmarinus officinalis* (alecrim) contra *Alternaria solani* em plantas de tomateiro em casa-de-vegetação e verificaram uma redução significativa no número de lesões em relação à testemunha, nas folhas acima das tratadas, observando efeito sistêmico dos extratos. Também BALBI-PEÑA et al. (2006a) avaliaram o controle de pinta preta em tomateiro (*Alternaria solani*) utilizando extratos de cúrcuma (*Curcuma longa*) e curcumina em comparação com fungicidas comerciais onde observaram que a curcumina e os extratos brutos desta planta apresentaram níveis de controle da pinta preta similares ao tratamento com o fungicida cúprico. Outros exemplos são relatados como o controle da mancha marrom (*Bipolaris sorokiniana*) em trigo usando extrato aquoso de cânfora (*Artemisia camphorata*) (FRANZENER et al., 2003), do oídio (*Oidium lycopersici*) do tomateiro pelo óleo emulsionável de *Azadirachta indica* (CARNEIRO, 2003), da antracnose (*Colletotrichum lagenarium*) em pepino pelo extrato de *Corymbia citriodora* (BONALDO et al., 2004) e do mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) em alface por *Zingiber officinale* (RODRIGUES et al., 2007).

SCHWAN-ESTRADA et al. (2000) relatam que extratos obtidos a partir de plantas da flora nativa, têm indicado o potencial das mesmas no controle de fitopatógenos tanto por ação fungitóxica direta como pela indução de fitoalexinas e desta forma, o fracionamento dos metabólitos destas plantas e a determinação da atividade biológica dessas moléculas em relação à atividade elicitora ou antimicrobiana poderão contribuir para a aquisição de maiores conhecimentos que reforcem sua possível utilização como um método alternativo no controle de doenças de plantas.

5. CONCLUSÕES

- O efeito antifúngico dos extratos brutos aquosos estudados, sobre *Colletotrichum gloeosporioides* é dependente da planta e concentração empregadas;
- Os extratos brutos aquosos das plantas estudadas apresentam potencial elicitador de fitoalexina dependente da concentração e da planta em que são aplicados;
- Em folha destacada de cajueiro, extratos brutos aquosos de alecrim pimenta e nim mostram ação de controle da antracnose do cajueiro provocada por *Colletotrichum gloeosporioides*;
- Extrato bruto aquoso de Alecrim pimenta demonstra elevado potencial para o controle alternativo da antracnose do cajueiro causada por *Colletotrichum gloeosporioides*.

6. REFERÊNCIAS

- AMORIM, A. C. L.; CARDOSO, M. G.; PINTO, J. E. B. P.; SOUZA, P. E.; DELÚ FILHO, N. Fungitoxic activity avaliation of the hexane and Methanol extracts of copaiba plant leaves *Copaifera langsdorffi* Desfon. **Ciência e Agrotecnologia**, v.28, p.314-322, 2004.
- ARAÚJO, J. P. P.; SILVA, V. V. **Cajucultura: modernas técnicas de produção**. Fortaleza-CE. EMBRAPA/CNPAT, 1995. 292 p.
- AYERS, A. R.; EBEL, J.; FINELLI, F.; BERGER, N.; ALBERSHEIM, P. Host-pathogen interactions IX. Quantitative assays of elicitor activity and characterization of the elicitor present in the extracellular medium of cultures of *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. **Plant Physiology**, v.57, p.751-759, 1976.
- BALBI-PEÑA, M. I.; BECKER, A.; STANGARLIN, J. R.; FRANZENER, G.; LOPES, M. C.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. Controle de *Alternaria solani* em tomateiro por extratos de *Curcuma longa* e curcumina - I. Avaliação *in vitro*. **Fitopatologia Brasileira** v.31, p.310-314, 2006.
- BALBI-PEÑA, M. I.; BECKER, A.; STANGARLIN, J. R.; FRANZENER, G.; LOPES, M. C.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. Controle de *Alternaria solani* em tomateiro por extratos de *Curcuma longa* e curcumina - II. Avaliação *in vivo*. **Fitopatologia Brasileira** v.31, p.401-404, 2006a.
- BIANCHI, A.; ZAMBONELLI, A.; ZECHINI D'AULERIO, A.; BELLESIA, F. Ultrastructural studies of the effects of *Allium sativum* on phytopathogenic fungi in vitro. **Plant Disease** v.81 p.1241-1246, 1997.
- BISWAS, K.; CHATTOPADHYAY, I.; BANERJEE, R. K.; BANDYOPADHYAY, U. Biological activities and medicinal properties of neem (*Azadirachta indica*), **Current Science**, v.82, n.11, p.1336-1345, 2002.

BONALDO, S. M.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. S. FIORI-TUTIDA, A. C. G. Contribuição ao estudo das atividades antifúngica e elicitora de fitoalexinas em sorgo e soja por eucalipto (*Eucalyptus citriodora*). **Summa Phytopathologica**, v.33, n.4, p.383-387, 2007.

BONALDO, S. M.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; TESSMANN, D. J.; SCAPIM, C. A. Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de pepino contra *Colletotrichum lagenarium*, pelo extrato aquoso de *Eucalyptus citriodora*. **Fitopatologia Brasileira** v.29, n.2, p.128-134, 2004.

BURDEN, R. J.; BAILEY, J. A. Structure of phytoalexin from soybean. **Phytochemistry**, v.14, p.1389-1390, 1975.

CAJUCULTURA: Produtos e derivados do cajueiro. **Cajucultura.com.br**, Fortaleza-CE. Disponível em: <<http://www.cajucultura.com.br/derivados.html>>, acesso em 25/01/2010.

CARNEIRO, S. M. T. P. G. Efeito de extratos de folhas e do óleo de nim sobre o oídio do tomateiro. **Summa Phytopathologica**, v.29, p.262-265, 2003.

CARRÉ, V.; STANGARLIN, J. R.; BECKER, A.; ZANELLA, A. L.; GONÇALVES Jr, A. C.; SCHWANESTRADA, K. R. F.; FRANZENER, G.; CRUZ, M. E. S. Controle pós-colheita de *Colletotrichum musae* em banana (*Musa* sp.) por cânfora (*Artemisia camphorata*) e quitosana. **Scientia Agraria Paranaensis**, v.5, n.1, p.57-66, 2006.

CATARINO, V. M.; GHINI, R.; BETTIOL, W.; FERNANDES, L. M. S; SCRAMIN, S. Influência de extratos de folhas de *Tagetes minuta* e *Vernonia polyantes* no crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*, *Botrytis cineria* e *Trichoderma* sp. **Summa Phytopathologica**, v.14, n. 1/2, p.43, 1998.

COLPAS, F. T.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; FERRARESE, M. L.; SCAPIM, C. A.; BONALDO, S. M. Induction of plant defense responses by *Ocimum gratissimum* L. (Lamiaceae) leaf extracts. **Summa Phytopathologica**, v.35, n.3, p.191-195, 2009.

COSTA, A. S. **Sustentabilidade da produção de Alecrim-Pimenta (*Lippia sidoides* Cham.): micropropagação visando a conservação *in vitro***. 2006. 56p. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas) - Núcleo de Pesquisa e Pós-Graduação e Estudos em Recursos naturais. Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão.

COSTA, L. C. B.; CORRÊA, R. M.; CARDOSO, J. C. W.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V.; FERRI, P. H. Secagem e fragmentação da matéria seca no rendimento e composição do óleo essencial de capim-limão. **Horticultura Brasileira** v.23, p.956-959, 2005.

COSTA, S. M. O.; LEMOS, T. L. G.; PESSOA, O. D. L.; PESSOA, C.; MONTENEGRO, R. C.; BRAZ-FILHO, R. Chemical Constituents from *Lippia sidoides* and Cytotoxic Activity. **Journal of Natural Products**, v.64, p.792-795, 2001.

DAFERERA, D. J.; ZIOGAS, B. N.; POLISSIOU, M. G. GC-MS Analysis of essential oils from some greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v.48, p.2576-2581, 2000.

DINIZ, L. P.; MAFFIA, L. A.; DHINGRA, O. D.; CASALI, V. W. D.; SANTOS, R. H. S.; MIZUBUTI, E. S. G. Avaliação de produtos alternativos para controle da requeima do tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31 n. 2, Brasília, p. 171-179. 2006.

DMITRIEV, A. P.; TVERSKOY, L. A.; KOZLOVSKY, A. G.; GRODZINSKY, D. M. Phytoalexins from onion and their role in disease resistance. **Physiological and molecular plant pathology**, v.37, n.4, p.235-244, 1990.

ESTAT. **Sistema para análises estatísticas** (V. 2.0). Departamento de Ciências Exatas, FCAV-UNESP, Jaboticabal, SP, 1994.

FONTENELLE, R. O. S.; MORAIS, S. M.; BRITO, E. H. S.; KERNTOPF, M. R.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; TOMÉ, A. R.; QUEIROZ, M. G. R.; NASCIMENTO, N. R. F.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** v.59, p.934-940, 2007.

FRANZENER, G.; STANGARLIN, J. R.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; CRUZ, M. E. S. Atividade antifúngica e indução de resistência em trigo a *Bipolaris sorokiniana* por *Artemisia camphorata*. **Acta Scientiarum Agronomy**, v.25, p.503-507, 2003.

FREIRE, F. C. O.; ROSSETTI, A. G. Controle químico da antracnose em mudas de cajueiro. Resumos, **XI Congresso Brasileiro de Fruticultura**, Petrolina, 1991.

GHINI, R.; KIMATI, H. **Resistência de fungos a fungicidas**. 1ª ed. Jaguariuna, Embrapa Meio Ambiente, 2000. 78 p.

GULLINO, M. L.; KUIJPERS, L. A. M. Social and political implications of managing plant diseases with restricted fungicides in Europe. **Annual Review of Phytopathology**, n. 32, p. 559-579, 1994.

GUZZO, S. D. **Elicitação da fitoalexina gliceolina em cotilédones de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) por polissacarídeos extracelulares de urediniósporos de *Hemileia vastatrix* berk.** Et br. ESALQ/USP, Piracicaba, 1989, 152 p. Dissertação (Mestrado)

HADDAD JÚNIOR, V. Skin manifestations caused by brazilian traumatic, allergenic, and venomous plants: main species, therapeutic and preventive measures, **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Disease**, v.10, n.3, p.199-206, 2004.

HIPSKIND, J.; HANAU, R.; LEITE, B.; NICHOLSON, R. L. Phytoalexin accumulation in sorghum: identification of an apigeninidin acyl ester. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.36, p.381-396, 1990.

IBGE – **Levantamento do Sistema de Produção Agrícola**. Rio de Janeiro v.21 n.11 p.1-80 nov.2009

ITAKO, A. T.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; TOLENTINO JR., J. B.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ M. E. S. Atividade antifúngica e proteção do tomateiro por extratos de plantas medicinais, **Tropical Plant Pathology**, v.33, n.3, p. 241-244, 2008.

- JOHNSON, D.V. The botany, origin and spread of cashew (*Anacardium occidentale* L.). **Journal of Plantation Crops**, Kasaragod, v.1, p.1-7, 1973.
- LEMOES, T. L. G.; MATOS, F. J. A.; ALENCAR, J. W.; CRAVEIRO, A. A.; CLARK, A. M.; McCHESNEY, J. D. Antimicrobial activity of essential oils of brazilian plants. **Phytotherapy Research**, Chichester, v.4, n.2, p.82-84, 1990.
- LIMA, N. G. P. B.; CABRAL, A. G. S.; FURTADO, F. F.; LIMA, I. P. B.; MACEDO, R. O. *Urtica dioica*: uma revisão dos estudos das suas propriedades farmacológicas, **Revista Brasileira de Farmacologia**, v.89, n.3, p.199-206, 2008.
- LIMA, V.P.M.S. Botânica. In: LIMA, V. P. M. S. **A cultura do cajueiro no Nordeste do Brasil**. Fortaleza: BNB/ETENE, 1988. p. 15 - 61.
- LO, L. C.; WEIERGANG, I.; BONHAM, C.; HIPSKIND, J.; WOOD, K.; NICHOLSON, R.L. Fitoalexin accumulation in sorghum: identification of a methyl ether of luteolinidin. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.49, p.21-31, 1996.
- LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 512p.
- MARTINS, E.R. **Plantas medicinais**. Viçosa: UFV, 2000.
- MAZARO, S. M.; CITADIN, I.; GOUVÊA A.; LUCKMANN D.; GUIMARÃES S. S. Indução de fitoalexinas em cotilédones de soja em resposta a derivados de folhas de pitangueira. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.7, p.1824-1829, 2008.
- MENDES, B. M. J.; BERGAMIN FILHO, A. Adaptação da técnica da cultura da folha destacada para a qualificação dos parâmetros epidemiológicos monocíclicos da ferrugem do feijoeiro (*Uromyces phaseoli* var. *typica*). **Fitopatologia Brasileira**, v.11, p.103-114, 1986.
- MENEZES, M. Doenças do cajueiro. In: KIMAT, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A; CAMARGO, L. E. A. (Eds.). **Manual de Fitopatologia**. v. 2. Doenças das plantas cultivadas. 4ª ed. São Paulo, Ceres, 2005. cap. 20, p. 181-184.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA - **Agrofit: Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários, consulta pragas e doenças**, Brasília – DF, disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>, acesso em 25/01/2010.

MOTA, M. **O cajueiro nordestino**. 3.ed. Recife: Fundação Cultura Cidade de Recife, 1982. 168p.

MOTOYAMA, M. M.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; FIORITUTIDA, A. C. G.; SCAPIM, C. A. Indução de fitoalexinas em soja e em sorgo e efeito fungitóxico de extratos cítricos sobre *Colletotrichum lagenarium* e *Fusarium semitectum*. **Acta Scientiarum Agronomy**, v.25, p.491-496, 2003.

NEVES, B. P.; OLIVEIRA, I. P.; NOGUEIRA, J. C. M. **Cultivo e Utilização do Nim Indiano**. EMBRAPA, Santo Antônio de Goiás, Circular Técnica 62, 2003.

NIJAZ, I.; SITARA, U.; QADRI, S. Effect of different seed oils and benlate fungicide on *in vitro* growth of four *drechslera* species. **Pakistan Journal of Botanic**, v.40 p.397-401, 2008.

NICHOLSON, R. L.; KOLLIPARA, S. S.; VINCENT, J. R.; LYONS, P. C.; CADENA-GOMEZ, G. Phytoalexin synthesis by the sorghum mesocotyl in response to infection by pathogenic and nonpathogenic fungi. **Proceedings of the National Academy Science** v.84, p.5520-5524. 1987.

NUNES, R. S.; LIRA, A. M. E.; XIMENES, J. A.; SILVA, SANTANA, D. P. Caracterização da *Lippia sidoides* Cham (Verbenaceae) como matéria-prima vegetal para uso em produtos farmacêuticos. **Scientia Plena** v.1, n.7, p.182-184, 2005.

OLIVEIRA, J. C. M.; PESSOA, M. N. G.; PINHEIRO, P. L. Ação antifúngica de Alecrim-Pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) sobre *Colletotrichum gloeosporioides* e *Sclerotium rolfsii* “*in vitro*”. **Fitopatologia Brasileira**, v.23 (Suplemento), n.313, p.265, 1998.

OLIVEIRA, O. R.; TERAPO, D.; CARVALHO, A. C. P. P.; INNECCO, R.; ALBUQUERQUE, C. C. Efeito de óleos essenciais de plantas do gênero *Lippia* sobre fungos contaminantes encontrados na micropropagação de plantas. **Revista Ciência Agronômica**, v.39, p.94-100, 2008.

OLIVEIRA, V. H. (Ed.), **Cultivo do cajueiro anão precoce**. Fortaleza, Embrapa Agroindústria Tropical, 2002.

PESSOA, M. N. G.; OLIVEIRA, J. C. M.; INNECCO, R. Efeito da tintura de Alecrim-Pimenta contra fungos fitopatogênicos “*in vitro*”. **Fitopatologia Brasileira**, v.21 (Supl.), n.417, p.404, 1996.

PIMENTEL, C.P.V.; LUCAN, C.M.M & FARIA, R.G., Ensaios “*in vitro*” para controle de fungos fitopatogênicos por extratos cítricos. **Fitopatologia Brasileira**, v.20 (Supl.), n.450, p.350, 1995.

PINELLI, P.; IERI, F.; VIGNOLINI, P.; BACCI, L.; BARONTI, S.; ROMANI, A. Extraction and HPLC analysis of phenolic compounds in leaves, Stalks, and Textile Fibers of *Urtica dioica* L. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, p.9127-9132, 2008.

QUIROGA, E. N.; SAMPIETRO, A. R.; VATTUONE, M. A. Screening antifungal activities of selected medicinal plants. *Journal of ethnopharmacology* v.74, p.89-96, 2001.

RADÜNZ, L. L.; MELO, E. C.; MARTINS, P. M.; SANTOS, R. H. S.; SANTOS, R. R.; MACHADO, M. C. Secagem de alecrim pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) em secador de leito fixo. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.5, p.79-82, 2002.

RIBEIRO, L. F.; BEDENDO, I. P. Efeito inibitório de extratos vegetais sobre *Colletotrichum gloeosporioides* - agente causal da podridão de frutos de mamoeiro. **Scientia Agricola** (Supl.) v.56, p.1267-1271, 1999.

RODRIGUES, E.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; FIORI-TUTIDA, A. C. G.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ M. E. S. Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas

e proteção de alface em sistema de cultivo orgânico contra *Sclerotinia sclerotiorum* pelo extrato de gengibre. **Summa Phytopathologica**, v.33, n.2, p.124-128, 2007.

SALGADO-GARCIGLIA, R.; MOLINA-TORRES, J.; LÓPEZ-MEZA, J. E.; LOEZA-LARA, P. D. Efecto del extracto crudo y los compuestos bioactivos de *Heliopsis longipes* sobre la incidencia de la antracnosis, Micorrización y nodulación del frijol, **Agrociencia** v.42, p.679-688, 2008.

SANTOS, M. M. F. B., PASCHOLATI, S. F., Efeito de duas formas de *Lippia alba* sobre o fungo *Colletotrichum gloeosporioides*. **Fitopatologia Brasileira**, v.21 (Supl.), n.286, p.382, 1996.

SAS INSTITUTE INC. **SAS/STAT**: user's guide. 2 ed., Cary, NC: SAS INSTITUTE, 1993.1022p.

SCHMUTTERER, H. Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. **Annual Review of Entomology**. Palo Alto, v.35, p.271-297, 1990.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J.R.; CRUZ, M. E. S. Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos. **Floresta**, n.30, p.129-137, 2000.

SILVA, F.; CASALI, V.W.D. **Plantas medicinais e aromáticas**: pós colheita e óleos essenciais. Viçosa: UFV, 2000. 135p

SILVA, M. G. V.; CRAVEIRO A. A.; MATOS F. J. A.; MACHADO M. I. L.; ALENCAR, J. W. Chemical variation during daytime of constituents of the essential oil of *Ocimum gratissimum* leaves. **Fitoterapia**, v.70, n.1, p.32-341, 1999.

SILVEIRA, A.; ALMEIDA, N. N. S.; RIBEIRO, N. M. S & LIMA, M. P. Efeito de extrato de Buceraceae “in vitro” de *Colletotrichum gloeosporioides*. **Fitopatologia Brasileira**, v.19 (Supl.), n.404, p.332, 1994.

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

SOUZA, A. E. F.; ARAÚJO, E.; NASCIMENTO, L. C. Atividade antifúngica de extratos de alho e capim-santo sobre o desenvolvimento de *Fusarium proliferatum* isolado de grãos de milho. **Fitopatologia Brasileira** v.32, p.465-471, 2007.

STANGARLIN, J. R.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; CRUZ, M. E. S.; NOZAKI, M. H. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. **Biotecnologia: Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 2, n. 11, p. 19-21, 1999.

WULFF, N. A.; PASCHOLATI, S. F. Preparações de *Saccharomyces cerevisiae* elicitoras de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo. **Scientia Agricola** v.55, p.138-143, 1998.

YAMAOKA, N.; LYONS, P. C.; HIPSKIND, J.; NICHOLSON, R. L. Elicitor of sorghum phytoalexin synthesis from *Colletotrichum graminicola*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.37, p.255-270, 1990.

ZADOKS, J. C. The costs of change in plant protection. **Journal of Plant Protection**. v.9, p.151-159, 1992.