

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

FRANCISCO REIVILANDIO DA S. B. JÚNIOR

**ESTUDO ANALÍTICO E ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO
ESSENCIAL DOS FRUTOS DA *Pimenta dioica* Lindl.**

São Luís
2011

FRANCISCO REIVILANDIO DA S. B. JUNIOR

**ESTUDO QUÍMICO E ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO
ESSENCIAL DOS FRUTOS DA *Pimenta dioica* Lindl.**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Química da
Universidade Federal do Maranhão, para
obtenção do título de Mestre em Química

Orientador: Prof. Dr. Victor Elias
Mouchrek Filho

São Luís
2011

Barros junior, Francisco Reivilandio da S.

Estudo químico e atividade antifungicoado óleo essencial dos frutos da *Pimenta dioica* lindl / Francisco Reivilandio da S. Barros Junior. – 2011.

f.:64 fls.

Orientador: Profª. Dr. Victor Elias Mouchrek Filho

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Maranhão, Programa de Pós – Graduação em Química, 2011.

1. Óleo essencial – Análise química 2. *Pimenta dioica* Lindl 3. Eugenol 4. Atividade antifúngica I. Título

CDU: 543.2:665.528

FRANCISCO REIVILANDIO DA S. B. JÚNIOR

**ESTUDO QUÍMICO E ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO
ESSENCIAL DOS FRUTOS DA *Pimenta dioica* Lindl.**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Química da
Universidade Federal do Maranhão, para
obtenção do título de Mestre em Química.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Victor Elias Mouchrek Filho
Doutor em Química Analítica - UFMA
(Orientador)

Prof. Dra. Antônia Alice Costa Rodrigues
Doutora em Agronomia - UEMA

Prof. Dra. Adaléia Lopes Brandes Marques
Doutora em Química Analítica - UFMA

Dedico este trabalho

*À minha mãe, **MARIA DONATÍLIA CONCEIÇÃO BARROS**, pelo amor, carinho e dedicação a mim para que nada me faltasse nesta minha caminhada.*

*Ao meu pai, **FRANCISCO REIVILANDIO DA SILVA BARROS**, pelo amor, pelos conselhos, pela dedicação e sua luta diária no trabalho para nosso conforto.*

*Aos meus filhos, **MARINA, ANA BEATRIZ, MARIA LUISA E JOÃO PEDRO**, que são a inspiração da minha vida.*

*Aos meus avós **RAIMUNDA BARROS e MANOEL BARROS** pelo belo complemento na minha educação de vida.*

Agradecimentos

*A Meu pai eterno **DEUS**.*

*Ao Prof. Dr. **VICTOR ELIAS MOUCHREK FILHO**, pelos ensinamentos, experiência e competência na orientação deste trabalho.*

*À Prof. Dra. **ANTÔNIA ALICE COSTA RODRIGUES**, pela disponibilidade, dedicação, competência e colaboração prestada na realização deste trabalho.*

*Ao Prof. Dr. **ODAIR DOS SANTOS MONTEIRO**, pelos anos de amizade, pelo companheirismo, pela disponibilidade, pela competência e experiência na orientação deste trabalho.*

*Aos amigos do Laboratório de Fitopatologia do programa de Pós – Graduação em Agroecologia da Universidade Estadual do Maranhão, em especial, **DANNIELLE PAZ, DIOGO e LEONARDO** pela contribuição nas análises fúngicas, pelo companheirismo, e troca de informações feitas sempre com muita ética e presteza.*

“O mundo é um lugar perigoso de se viver, não por causa daqueles que fazem o mal, mas sim por causa daqueles que observam e deixam o mal acontecer”

Albert Einstein

RESUMO

A pimenta da Jamaica, *Pimenta dioica* Lindl, é uma espécie vegetal pertencente à família *Mirtacea*, medindo de 6 a 15 m de altura, muito aromática em todas as suas partes. É originária da América Central e Oeste da Índia e com grande importância econômica no mercado de óleos essenciais. A extração do óleo essencial das sementes da *P. dioica* foi realizada pelo método da hidrodestilação utilizando o sistema Cleverger. Foi extraído um volume máximo de óleo no tempo de quatro horas com um rendimento de 2,8 %m/m. As técnicas espectrofotométricas de UV, espectrometria de massa e cromatografia gasosa, assim como as constantes físicas, densidade, cor e aparência foram utilizadas para identificar o composto eugenol e os demais constituintes do óleo essencial da *P. dioica*. Através da técnica de padrão externo e adição de padrão quantificou-se o eugenol com um percentual de 76,98 %, constituindo-se o componente majoritário. O óleo essencial da *P. dioica* foi aplicado em fungos fitopatogênicos das espécies *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae*, *Fusarium subglutinans* f. sp. *ananas*, *Fusarium* f. sp. *vasinfectum* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, obtendo-se uma inibição total do crescimento micelial de todas as espécies testadas por um período de dez dias de avaliação.

Palavras-chave: Óleo Essencial; *Pimenta dioica* Lindl; Eugenol; Atividade Antifúngica

ABSTRACT

Jamaican pepper, *Pimenta dioica* Lindl, is a species belonging to the family of Myrtaceae, measuring 6m to 15m high, very aromatic in all its parts. It is originally from Central America and West India and with great economic importance in the market of essential oils. The extraction of the essential oil of *Pimenta dioica* L seeds was carried out by using the method of hydrodistillation known as Cleverger system. It was extracted from a maximum volume of oil in the period of four hours with a yield of 2.8% m/m. The UV spectrophotometric techniques, mass spectrometry and gas chromatography, as well as the physical constants, density, color and appearance were used to identify the compound eugenol and other constituents of the essential oil of *P. dioica* L. Through the technique of external standard and standard addition it was quantified with a eugenol percentage of 76.98%, forming the major component. The essential oil of *Pimenta dioica* L was applied to the phyto pathogenic fungi species *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae*, *Fusarium subglutinans* f. sp *ananas.*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* resulting in a total inhibition of mycelial growth of all species tested for a period of ten days of evaluation.

Keywords: Essential Oil; *Pimenta dioica* Lindl; Eugenol; Antifungal Activity

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Árvore da espécie <i>P. dioica</i> (pimenta da Jamaica).....	5
Figura 2.	Folhas, Flores e Frutos da <i>P. dioica</i>	6
Figura 3.	Fórmula Estrutural Plana do Eugenol	7
Figura 4.	Sistema Extrator de Cleverger	25
Figura 5.	Espectro da região infravermelho: (A) Padrão de Eugenol; (B) Óleo Essencial	30
Figura 6.	Cromatograma da amostra do óleo dos frutos da <i>P. dioica</i> apresentando os picos selecionados e identificados através dos respectivos espectros de massas com a espectroteca NIST02.....	32
Figura 7.	Espectro de massas de (A) composto do pico 2 do cromatograma da figura 6 e (B) proposta de identificação através da espectroteca NIST02 ...	34
Figura 8.	Espectro de massas de (A) composto do pico 4 do cromatograma da figura 6 e (B) proposta de identificação através da espectroteca NIST02....	35
Figura 9.	Espectro de massas de (A) composto do pico 5 do cromatograma da figura 6 e (B) proposta de identificação através da espectroteca NIST02 ...	36
Figura 10.	Fragmentação tipo reação retro Diels – Alder do Limoneno.....	36
Figura 11.	Espectro de massas de (A) composto do pico 9 do cromatograma da figura 6 e proposta de identificação através da espectroteca NIST02	37
Figura 12.	Espectro de massas de (A) composto do pico 10 do cromatograma da figura 6 e (B) proposta de identificação através da espectroteca NIST02 ...	38
Figura 13.	Efeito inibitório do óleo essencial da <i>P. dioica</i> sobre diferentes espécies de Fusarium em meio BDA após dez dias de incubação (25 ± 2 °C).....	40
Figura 14.	Gráfico do percentual de inibição do crescimento micelial fungo do tomateiro após a aplicação do óleo essencial da <i>P. dioica</i> em meio BDA em dez dias de incubação a (25 ± 2 °C).....	43
Figura 15.	Gráfico do percentual de inibição do crescimento micelial fungo da Heliconia após a aplicação do óleo essencial da <i>P. dioica</i> em meio BDA em dez dias de incubação a (25 ± 2 °C).....	46
Figura 16.	Gráfico do percentual de inibição do crescimento micelial fungo da Quiabeiro após a aplicação do óleo essencial da <i>P. dioica</i> em meio BDA em dez dias de incubação a (25 ± 2 °C).....	47
Figura 17.	Gráfico do percentual de inibição do crescimento micelial fungo do Abacaxizeiro após a aplicação do óleo essencial da <i>P. dioica</i> em meio BDA em dez dias de incubação a (25 ± 2 °C).....	49
Figura 18.	Gráfico do percentual de inibição do crescimento micelial fungo do Maracujazeiro após a aplicação do óleo essencial da <i>P. dioica</i> em meio BDA em dez dias de incubação a (25 ± 2 °C).....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Isolados de <i>Fusarium</i> obtidos na Micoteca do Laboratório de Fitopatologia da UEMA	27
Tabela 2.	Propriedades físicas do óleo essencial extraído de frutos da espécie <i>P. dioica</i>	29
Tabela 3.	Bandas de absorção e modos vibracionais do padrão de eugenol e do óleo essencial na região do infravermelho	31
Tabela 4.	Teor dos componentes identificados através do espectro de massas da amostra dos frutos da <i>P. dioica</i> onde Tr = tempo de retenção, desvpad = desvio padrão.....	33
Tabela 5.	Efeito do óleo essencial de <i>P. dioica</i> sobre o crescimento micelial de diferentes espécies de <i>Fusarium</i> em meio BDA por 10 dias de incubação a 25 ± 2 °C.....	39
Tabela 6.	Efeito do óleo essencial da <i>P. dioica</i> sobre o crescimento micelial da espécie <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> em meio BDA após 10 dias de incubação a $(25 \pm 2$ °C).....	43
Tabela 7.	Efeito do óleo essencial da <i>P. dioica</i> sobre o crescimento micelial da espécie <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> em meio BDA após 10 dias de incubação a $(25 \pm 2$ °C).....	45
Tabela 8.	Efeito do óleo essencial da <i>P. dioica</i> sobre o crescimento micelial da espécie <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i> em meio BDA após 10 dias de incubação a $(25 \pm 2$ °C).....	47
Tabela 9.	Efeito do óleo essencial da <i>P. dioica</i> sobre o crescimento micelial da espécie <i>Fusarium subglutinans</i> em meio BDA após 10 dias de incubação a $(25 \pm 2$ °C).....	49
Tabela 10	Efeito do óleo essencial da <i>P. dioica</i> sobre o crescimento micelial da espécie <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>passiflorae</i> em meio BDA após 10 dias de incubação a $(25 \pm 2$ °C).....	50

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AFs	Aflatoxinas
ASSISTAT	Sistema de assistência estatística
CG-ME-IE- íon Trap	Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas por impacto de elétrons
CG	Cromatografia gasosa
CG – MS	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DIC	Delineamento Inteiramente Casualizado
FAO	Food Agriculture Organization
IBD	Instituto Biodonâmico
IE	Impacto de elétrons
EM	Espetroscopia de massas
OMS	Organização mundial de saúde
NIST	National Institute of standards and Technology
LPQA	Laboratório de Pesquisa em Química Analítica
RMN	Ressonância nuclear magnética
IV	Infravermelho
UV	Ultravioleta
UV –VIS	Espectroscopia do Ultravioleta - Visível
PIC	Inibição do Crescimento Micelial
BDA	Meio de cultura Batata àgar dextrose
CV	Coefficiente de variação
DMS	Diferença Mínima Significativa

SUMÁRIO

	RESUMO.....	i
	ABSTRACT.....	ii
	LISTA DE FIGURAS.....	iii
	LISTA DE TABELAS.....	iv
	LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	v
1	INTRODUÇÃO.....	1
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1	Definição e características.....	3
2.1.1	Processos de extração.....	3
2.1.2	Controle de qualidade de óleos essenciais.....	3
2.1.3	Análise dos componentes dos óleos essenciais.....	4
2.2	Aspectos gerais sobre a <i>P. dioica</i>	4
2.2.1	Clima e solo.....	6
2.3	Oleo essencial da espécie <i>P. dioica</i>	6
2.3.1	Técnicas Analíticas.....	7
2.3.1.1	Cromatografia gasosa.....	8
2.3.1.2	Espectroscopia Vibracional na região Infravermelho (IV).....	9
2.3.1.3	Métodos de quantificação.....	10
2.4	Fungos fitopatogênicos.....	10
2.4.1.	O gênero <i>Fusarium</i>	11
2.5	Aspectos gerais sobre os hospedeiros e espécies de <i>Fusarium</i>	13
2.5.1	Tomateiro (<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill)	13
2.5.1.1	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> (Snyder & Hansen)	14
2.5.2	Maracujazeiro (<i>Passiflora edulis</i> f. sp. <i>favicarpa</i> Deneger)	14
2.5.2.1	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>passiflorae</i> .(Pruss Schlecht)	15
2.5.3	Abacaxizeiro (<i>Ananas comusus</i> L) Merrill	16
2.5.3.1	<i>Fusarium subglutinans</i> f. sp. <i>ananas</i> (Wollen & Reiking).	17
2.5.4	Quiabeiro (<i>Albemoschus esculentus</i> L) Moench	18
2.5.4.1	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i> (Atk.) Snyd & Hans.....	19
2.5.5	Heliconia (<i>Heliconia</i> L).....	19
2.5.5.1	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	20
2.6	Medidas de controle.....	21
3	OBJETIVOS.....	23
3.1	Objetivo geral.....	23

3.2	Objetivos específicos.....	23
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	24
4.1	Local do experimento.....	24
4.2	Coleta dos frutos da <i>P. dioica</i>	24
4.3	Extração do óleo essencial da <i>P. dioica</i>	24
4.4	Caracterização física do óleo essencial.....	25
4.5	Análise espectroscópicas.....	26
4.5.1	Análise Espectroscópica Vibracional na região do infravermelho.....	26
4.5.2	Análise por Cromatografia gasosa acoplada a Espectroscopia de massas.....	26
4.6	Avaliação do óleo essencial de <i>P. dioica</i> sobre as espécies de <i>Fusarium</i>	26
4.6.1	Obtenção dos isolados de <i>Fusarium</i>	26
4.6.2	Efeito inibitório in vitro do óleo essencial da <i>P. dioica</i> sobre os isolados de <i>Fusarium</i>	27
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
5.1	Características físicas do óleo essencial da <i>P. dioica</i>	29
5.2	Análises espectrofotométricas e cromatográficas do óleo essencial dos frutos da espécie <i>P. dioica</i>	29
5.2.1	Análise espectroscópica vibracional na região do infravermelho.....	29
5.2.2	Cromatografia gasosa acoplada a Espectroscopia de massas.....	32
5.3	Avaliação do efeito do óleo essencial da <i>P. dioica</i> em diferentes espécies de <i>Fusarium</i>	39
5.3.1	Análise da atividade antifúngica da <i>P. dioica</i> sobre o <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	42
5.3.2	Análise da atividade antifúngica da <i>P. dioica</i> sobre o <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	45
5.3.3	Análise da atividade antifúngica da <i>P. dioica</i> sobre o <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i>	46
5.3.4	Análise da atividade antifúngica da <i>P. dioica</i> sobre o <i>F. subglutinans</i>	48
5.3.5	Análise da atividade fungicida da <i>P. dioica</i> sobre o <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>passiflorae</i>	50
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	52

APENDICE

Apêndice 1. Certificado da espécie *Pimenta dioica* L. emitido pelo IBD.....64

1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais e derivados apresentaram-se como base terapêutica para muitas doenças durante o século XIX, porém de modo empírico. Com o advento das pesquisas científicas, muitas substâncias presentes, puderam ser isoladas e utilizadas como modelos para futuros fármacos (YUNES; CECHINEL FILHO, 2001).

Algumas dessas plantas pertencem à família *Myrtaceae*, de grande importância na Flora Brasileira, com 23 gêneros e aproximadamente 1.000 espécies, tendo como uma de suas características principais, a secreção de óleos essenciais. Entre os representantes de interesse medicinal dessa família destaca-se a *Pimenta dioica* Lindl (LANDRUM; KAVASAKI, 1997).

Vários trabalhos científicos têm demonstrado as diversas aplicações do óleo essencial da *Pimenta dioica* tais como, antimicrobiano, anti-hipertensivo, antiinflamatório, analgésico e larvicida (ODAIR, 2004, VALDEZ JUNIOR, 2010, RIBEIRO, 2009, MUNIZ, 2006, LOPÉZ et al, 1998, MARINHO, 2010).

A utilização de subprodutos de plantas medicinais como extrato bruto e óleo essencial tem sido utilizada recentemente no controle de fungos fitopatogênicos devido as suas propriedades fungicidas e como alternativa de substituição por produtos sintéticos (MATOS, 1997).

Neste contexto, os óleos essenciais representam uma alternativa viável em diversos trabalhos envolvendo substâncias de origem vegetal. Porém, é necessário que as técnicas de análises químicas desses óleos sejam aperfeiçoadas ou, até mesmo, que novas técnicas sejam aplicadas para uma melhor caracterização de seus componentes.

Nesse trabalho, algumas técnicas espectroscópicas como espectrometria vibracional na região do infravermelho, cromatografia gasosa e espectrometria de massas, foram aplicadas para a caracterização do óleo essencial da *Pimenta dioica* Lindl.

As técnicas espectroscópicas foram eficientes para a confirmação e identificação do eugenol como componente majoritário, com teor de 76,98%, e de componentes minoritários no óleo essencial da *Pimenta dioica*. A

espectroscopia na região do infravermelho indicou a presença desses componentes, principalmente pelas vibrações moleculares de seus grupos funcionais contendo oxigênio. A espectroscopia de massas mostrou as fragmentações, intensidades e vizinhanças dos picos característicos das moléculas de eugenol e dos demais compostos. Ficou evidenciado, também, que o uso do óleo essencial da *Pimenta dioica* L. como agente fungicida frente aos fungos fitopagênicos, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* e *Fusarium subglutinans* mostrou-se promissor.

Atualmente, além da caracterização, procura-se expandir a utilização dos óleos essenciais. Esses óleos já são usados na indústria de cosméticos, na indústria farmacêutica, entre outras.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Definição e características

A *International Standart Organization* (ISO) define óleos essenciais como os produtos obtidos de partes de plantas através de destilação por arraste de vapor d'água, bem como os produtos obtidos por expressão dos policarpos de frutos cítricos (*Rutacaceae*). De forma geral, são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas. Também podem ser chamados de óleos voláteis, óleos etéreos ou essenciais. Eles são assim chamados por serem: geralmente de aparência oleosa e serem líquidos; voláteis; geralmente possuírem aroma agradável; serem solúveis em solventes apolares, como o éter. Em água, eles apresentam solubilidade limitada, mas o suficiente para aromatizar suas soluções aquosas, que nesse caso são denominadas hidrolatos (DI STASI, 1996; LEMOS, 1990).

A constituição química dos óleos essenciais é muito complexa, chegando a algumas dezenas de compostos com funções orgânicas diferentes: hidrocarbonetos, alcoóis, aldeídos, cetonas, éteres e fenóis.

2.1.1 Processos de extração

Os métodos de extração dos óleos essenciais variam de acordo com a parte da planta em que ele se encontra, bem como, com a proposta de utilização do mesmo. Os mais comuns são: enfloração (*enfleurage*) arraste por vapor d'água, extração com solventes orgânicos, prensagem (ou expressão) e extração por CO₂ supercrítico (DI STASI, 1996; LEMOS, 1990; WILLIANS, 1996; CRAVEIRO, 1981).

2.1.2 Controle de qualidade de óleos essenciais

Os óleos essenciais apresentam freqüentemente problemas de qualidade, que podem ter origem na variabilidade da sua composição química, na adulteração ou falsificação ou, ainda, na identificação incorreta do produto e sua origem. Os produtores de grande parte dos óleos essenciais

comercializados não apresentam a identificação correta da planta da qual o produto foi obtido, a parte do vegetal que foi empregado e a procedência do mesmo (SIMÕES, 1999).

Estima-se que aproximadamente 80 % dos óleos essenciais disponíveis no mercado não mais apresentam sua composição original. Sabe-se que existe uma grande variedade de estratégias sofisticadas de falsificações e, dessa forma, torna-se mais difícil detectá-las. Devido a esta problemática fica cada vez mais intenso o uso de métodos de avaliação para o controle dos óleos essenciais. Dentre os métodos, destaca – se a solubilidade em etanol a 70 %, índice de refração, densidade, ponto de ebulição, além de análises cromatográficas (SIMÕES, 1999).

2.1.3 Análises dos Componentes dos Óleos Essenciais

A análise química de separação e identificação dos constituintes dos óleos é feita por meio de técnicas de Cromatografia Gasosa, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CG e CLAE) (KIRK, 1981; ROBLES, 1998; WEYERSTAHL, 1998) e Espectroscópicas (SILVERSTEIN, 2000), dentre as quais as mais freqüentes são a Espectroscopia de Ultravioleta (UV), Infravermelho (IV), Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e de Carbono 13 (RMN ^1H e ^{13}C) e a Espectrometria de Massas (EM), além do uso de bibliotecas contendo informações existentes na literatura de um grande número de substâncias já conhecidas (CAVICCHIOLI, 1986; KOLLMANNSBERGER, 1993; DI STASI, 1996; FAJARDO, 1997).

2.2 Aspectos Gerais sobre a *P. dioica*

A *P. dioica* (Figura 1), também conhecida como Pimenta da Jamaica, é uma árvore de 6 a 15 m de altura, que pertence à família Mirtaceae e tem como origem a América Central e Oeste da Índia (CAVICCHIOLI, 1986; WEYERSTAHL, 1998). Estas foram encontradas primeiramente na Jamaica por exploradores espanhóis que ficaram bastante impressionados com o gosto e aroma dos seus frutos e folhas. Outras árvores de pimenta foram depois

descobertas em Cuba e foram atribuídas a pássaros migratórios, que comeram dos seus frutos. Elas também foram encontradas no México, mas foi na Jamaica que estas foram identificadas por volta do ano 1509 (GUENTHER, 1950).



Figura 1. Árvore da espécie *P. dioica* L. Fonte: (MONTEIRO, 2004).

O nome “pimenta” foi atribuído ao fruto seco da árvore da “allspice” e foi originário da palavra “pimenta” (termo espanhol para pimenta) por exploradores espanhóis, logo depois que Colombo descobriu o Novo Mundo. Este termo foi completamente impróprio, pois foi baseado somente na aparência visual com o grão de pimenta preta, no que diz respeito ao tamanho, forma e aroma (GUENTHER, 1950; PARRY, 1969; KATZER, 2010; ASTA, 2004).

A espécie é uma árvore fortemente aromática em todas as suas partes, apresentam folhas pecioladas, elípticas alongadas; flores numerosas, pequenas, dispostas em cimeiras axilares (Figura 2) (CORREA, 1978).



Figura 2. Folhas, flores e fruto da *P. dioica* L. Fonte: (PLANT IMAGES, 2003).

2.2.1 Clima e Solo

O clima mais propício para o cultivo da *P. dioica* L. é o quente e úmido, com precipitação pluviométrica acima de 1300 mm, chuvas bem distribuídas durante a maioria dos meses do ano, temperatura média de 25°C e umidade relativa em torno de 80 %. O solo deve ser de textura média e bem drenado com relevo plano ou levemente inclinado com pH entre 5,0 e 6,0.

2.3 Óleo Essencial da Espécie *P. dioica*

Estudos fitoquímicos de seus frutos não detectaram a presença de alcalóides e sim de compostos tanínicos e grande quantidade de óleo essencial (SIMÕES, 1999).

A extração, para fins de comercialização, é feita com frutos secos, por meio de arraste a vapor. O rendimento da extração varia em torno de 2 % (m/m), o seu principal componente químico é o Eugenol (Figura 3) com cerca de 65-85 % (m/m), o que confere ao óleo uma alta cotação no mercado internacional, alcançando valores de até 150 dólares por litro (FONT QUER, 1967), devido a sua utilização como fonte de extração de Eugenol para a síntese da vanilina (CRAVEIRO, 1981).

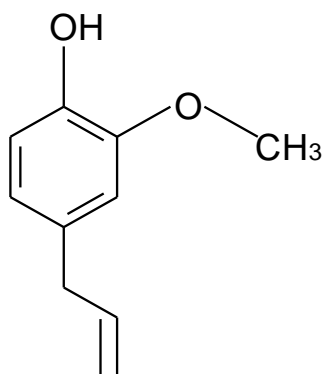


Figura 3. Fórmula estrutural plana do eugenol

O Eugenol é um líquido fracamente amarelado, que escurece ao ar, com aroma de cravo, e com sabor ardente e picante. Sua fórmula molecular é $C_{10}H_{12}O_2$ e massa molar 164g/mol (MOUCHREK FILHO, 2000). Este é muito usado como flavorizante (CRAVEIRO, 1981), antioxidante (FAJARDO, 1997), antiespasmódico (MOUCHREK FILHO, 2000), anti-séptico, agente antimicrobiano, agente bactericida, fungicida, inibidor inflamatório (OMS, 2010), antialérgico, na composição de cosméticos assim como no tratamento de AIDS (ATRASSO, 2010).

Atualmente alguns produtos obtidos por sínteses químicas, a partir do Eugenol, tais como: o metileugenol e o acetato de eugenila adquiriram um elevado valor comercial, devido às utilizações desses produtos como princípios ativos nas indústrias agroquímicas, substituindo os atuais defensivos agrícolas, por atrativo de insetos (feromônios), nas indústrias farmacêuticas e de cosméticos (MOUCHREK FILHO, 2000), respectivamente.

2.3.1 Técnicas Analíticas

As técnicas analíticas permitem a avaliação da qualidade do óleo essencial, garantindo, assim, a constância de seus constituintes químicos e a segurança de sua utilização.

A avaliação quantitativa e qualitativa de óleos essenciais envolve a utilização de diversas técnicas analíticas, que sofreram algumas alterações nos últimos anos, devidas essencialmente a evolução da informática

(programas de computadores, níveis de automação, forma de integração dos dados obtidos) e da sofisticação dos experimentos que podem ser realizados, resultando na dedução de uma estrutura química pertinente. Dentre estas podemos citar: a Cromatografia Gasosa, Espectroscopia Vibracional de Infravermelho (IV) e Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM) (MOUCHREK FILHO, 2000; CHAAR, 2000).

2.3.1.1 Cromatografia Gasosa (CG)

A análise de misturas complexas como os óleos essenciais requer a aplicação de métodos analíticos modernos e instrumentação adequada. Diferentes técnicas cromatográficas são predominantes na análise de voláteis; em particular, métodos de cromatografia gasosa que resultam na separação da mistura em componentes individuais (SCHREIER, 1984; LANÇAS, 1993). Assim, a cromatografia permite determinar, qualitativamente e quantitativamente, as frações individuais observadas nos cromatogramas.

Existem no mercado várias empresas que oferecem o conjunto cromatográfico a gás-espectrometria de massas (CG-EM), acoplado por meio de uma interface que aumenta a concentração da amostra no gás de arraste, aproveitando à maior difusibilidade do gás. A velocidade de varredura é grande o suficiente para permitir a obtenção de diversos espectros de massas por pico eluído no cromatógrafo (BUDZIKIEWICZ, 1964).

A conexão direta de colunas capilares de cromatografia gasosa ao espectrômetro de massas, sem a interface de enriquecimento, permite várias varreduras de massas rápidas em pontos diferentes de um pico cromatográfico, de modo a testar sua homogeneidade. Desse modo, é possível resolver picos cromatográficos parcialmente superpostos. Assim, a espectrometria de massas acoplada à cromatografia gasosa fornece as fragmentações dos componentes individuais separados (ADAMS, 1995).

Na técnica de impacto de elétrons (IE), mais comumente usada em espectrometria de massas, um espectrômetro de massas bombardeia moléculas na fase vapor com um feixe de elétrons de alta energia e registra o resultado do impacto dos elétrons como um espectro de íons separados na base da razão

massa/carga (m/z). A maior parte dos íons formados tem carga unitária. Os espectros de massas são obtidos rotineiramente com o uso de um feixe eletrônico de energia de 70 elétron – volt (eV) . O evento mais simples que pode ocorrer em fase gasosa é a remoção de um único elétron pelo feixe, com formação do íon molecular, um cátion-radical (M^+). O ponto simples representa o elétron desemparelhado. A maior parte dos íons desintegra-se em 10^{-10} - 10^{-3} s, dando, no caso mais simples, um fragmento carregado positivamente e um radical. Assim, forma-se certo número de fragmentos iônicos que podem ser posteriormente decompostos em fragmentos menores.

Pode-se apresentar o espectro na forma de um gráfico ou uma tabela. O gráfico tem a vantagem de mostrar seqüências de fragmentação que com a prática podem ser facilmente reconhecidas. No espectro de massas por impacto de elétrons, gerado por um computador na forma de um gráfico de barras, a abundância relativa dos picos apresentados como percentagem do pico base (100 %), é lançada contra a razão massa/carga (m/z). (SILVERSTEIN, 2000).

2.3.1.2 Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho (IV)

A espectroscopia no infravermelho pode ser usada para obter informações acerca dos grupos funcionais da composição dos óleos essenciais, principalmente grupos contendo oxigênio, uma vez que as vibrações moleculares são perceptíveis nessa região do espectro. Apesar de ser uma técnica altamente sensível, é pouco seletiva no caso de misturas de multicomponentes, e difícil para fazer medidas quantitativas de concentrações de componentes individuais (RALPH, 1983).

A espectroscopia na região do infravermelho (IV) é uma das ferramentas mais comuns para a identificação de compostos orgânicos e inorgânicos puros, pois, com exceção de poucas moléculas homonucleares, tais como O_2 , N_2 e Cl_2 , todas as espécies moleculares absorvem radiação no IV. A intensidade de absorção é uma função da variação do momento de dipolo envolvido na vibração (CRACKER, 1987).

Duas categorias básicas de vibrações moleculares são conhecidas: as vibrações de deformações axiais e as de deformações angulares. Uma vibração de deformação axial (estiramento) envolve uma mudança contínua na distância interatômica ao longo do eixo da ligação entre dois átomos. Vibrações de deformação angular são caracterizadas pela mudança no ângulo entre duas ligações. O espectro IV é obtido depois que uma transformação de Fourier converte o interferograma do domínio do tempo à forma mais familiar do domínio de frequências. O interferograma é uma série oscilatória de combinações destrutivas ou construtivas, resultando de uma variação completa de comprimentos de onda (SILVERSTEIN, 2000).

2.3.1.3 Métodos de quantificação

Na análise quantitativa são necessárias precauções em todas as etapas para minimizar ou evitar erros. A alíquota a ser analisada deve ser representativa da amostra. Em cromatografia, a etapa de separação dos componentes da amostra no cromatógrafo pode acarretar erros como: adsorção irreversível de parte da amostra na fase estacionária ou suporte, resposta do detector afetada por alterações de temperatura e vazão de gás, quantidade de amostra injetada fora da faixa linear do detector etc. (RODRIGUES, 1996).

A concentração de uma substância na amostra pode ser determinada por um dos seguintes métodos: método do padrão externo, método da adição padrão, método do padrão interno e método da normalização. No presente trabalho, utilizou-se o método da normalização. Neste método, faz-se a integração eletrônica das áreas dos picos cromatográficos utilizando um software do equipamento CG-EM (Varian 2100). A normalização é muito usada em técnicas analíticas, principalmente em amostras complexas, como é o caso dos óleos essenciais e, também, quando a concentração do analito é muito baixa e existem efeitos de diluição em matrizes (Pino et al., 1989).

2.4 Fungos fitopatogênicos

Os fungos representam um dos maiores grupos de organismos da Terra, estão em atividade nas florestas, nos campos e depósitos de lixo degradando restos de organismos, sua habilidade em decompor substâncias tem sido muito importante para a vida, devido à capacidade de quebrar compostos de carbono e devolver esse e outros elementos para a reutilização pelo ambiente. Possuem grande adaptação para nutrição absorptiva, secretam enzimas digestivas que degradam grandes moléculas de alimento do ambiente e depois absorvem o produto da degradação (PURVES, 2005).

De acordo com Agrios (2005), existem cerca de 100.000 espécies de fungos identificados, dentre as quais, em torno de 8.000 são causadoras de doenças em plantas.

Kimati; Bergamim (1997) citam que as culturas exploradas economicamente são infectadas por diversos fitopatógenos, entre eles, merecem destaque os fungos, habitantes do solo que provocam doenças, e dependendo do patógeno, desenvolvem lesões nos órgãos de reserva (frutos, sementes, etc.), no caule, nas raízes, no sistema vascular (xilema) e nas plântulas. Dependendo da intensidade da doença pode levar a planta à morte, portanto, originando uma queda de produção e prejuízos financeiros para os produtores.

2.4.1 O gênero *Fusarium*

Os fungos pertencentes ao gênero *Fusarium* são patógenos de planta e também contaminantes de alimentos, são responsáveis por numerosas micoses em animais e humanos. Como fitopatógeno de planta atua causando murcha através do micélio que invade o tecido vascular da planta e junto com os conídios bloqueiam o xilema, evitando deste modo o movimento de água. Quando este bloqueio é considerável, ocorre à murcha (MONTEIRO, 2004). O *Fusarium oxysporum* é o agente causal da murcha em plantas (FREIRE, 2006).

As espécies do gênero *Fusarium* comportam-se como um dos principais agentes causais de doenças de plantas cultivadas, induzindo os mais variados sintomas, como murchas vasculares, podridões de raízes, *damping-off*, além de outros, caracterizando-se como patógeno de grande expressão econômica,

frente aos danos causados tanto na qualidade, como em perdas de produção. A maioria das murchas é causada pela espécie *Fusarium oxysporum* Schlecht, que possui uma gama expressiva de hospedeiros, afetando as plantas através de diversas formas especiais, com base na especificidade do hospedeiro. (AGRIOS, 2005).

As espécies do gênero *Fusarium* apresentam como características morfológicas: macroconídeos multiceptados, arqueados em esporodóquios ou polifiádes, e microconídeos em cadeias ou grupos de falsas cabeças. Os microconídeos são pequenos, ovalados em conidiófaros simples ou ramificados (MENEZES, 1993).

O gênero *Fusarium* pertence à classe dos Deuteromicetos, subclasse Hyphomicetidae, ordem Moniliares e família Tuberculariace, porém, de acordo com a nova classificação, a espécie *Fusarium oxysporum* é denominado fungo mitospórico, por ser um fungo imperfeito, sem forma perfeita definida, correspondente a Ascomicetos ou Basidiomicetos, classificados pela ausência ou não constatação de estruturas decorrentes de reprodução sexuada (ALEXOPOULOS et al., 1996).

As murchas apresentam sintomas típicos de insuficiência de água nas partes aéreas da planta, o que faz com que ocorra perda da turgescência de suas células. As murchas podem ser causadas por diferentes meios, entre eles: deficiências hídricas; insuficiência de absorção de água pelas raízes; descontinuidade da translocação de água pelo xilema da planta; destruição parcial das raízes por insetos ou patógenos; colapso do sistema de transporte por ataque de patógenos (PUTZKE, 1998).

A espécie do gênero *Fusarium* está bem representada entre as comunidades de fungos do solo, é um componente normal das comunidades de fungos da rizosfera de plantas. Grande parte dos isolados são saprófitos e capazes de sobreviver e crescer por longos períodos em matéria orgânica, outros são patogênicos em espécies de vegetais diferentes (FRAVEL et al., 2003).

A colônia de *F. oxysporum* apresenta um micélio branco e felpudo, transformando-se em vermelho púrpura, e em análise microscópica observa-se

a produção de macro e microconídeos. Os macroconídeos são septados em forma alantóide (BARIK et al., 2010).

2.5 Aspectos gerais sobre os hospedeiros e espécies de *Fusarium*.

2.5.1 Tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill)

O tomateiro teve sua primeira denominação científica elaborada por Tournefort em 1694 que o classificou genericamente de *Lycopersicon* com significação de “pêssego de lobo”. Em 1753 Linnaeus utilizando o sistema binominal o reclassificou como sendo do gênero *Solanum*. Miller em 1754 o reclassificou de *Lycopersicon*. Em 1768 Miller descreveu várias espécies e chamou o tomate cultivado de *L. esculentum*. Atualmente através de estudos avançados com utilização de técnicas de DNA, morfologia e de distribuição de plantas, taxonomistas e geneticistas têm a tendência de retornar à nomenclatura *Solanum lycopersicon*. O tomateiro apresenta-se como uma *Solonacea* herbácea com caule flexível e piloso com aspecto que lembra uma moita de abundante ramificação lateral. O fruto é do tipo baga com diferentes tamanhos e formatos, apresenta película, polpa, placenta e sementes. Internamente este fruto é dividido em lóculos onde as sementes encontram-se imersas na mucilagem placentária (SANTOS, 2009).

O tomateiro ocupa um lugar de destaque entre as hortaliças no Brasil, segundo dados do IBGE referentes aos últimos anos, 55 a 60 mil hectares são utilizados para essa cultura, destes 35 a 40 mil hectares são cultivados para comercialização “in vitro” (produção em torno de 1,5 a 1,7 milhões de toneladas) e 20 a 25 mil hectares destinados ao processamento industrial para a obtenção de polpas, molhos, catchup, etc (PIERRO, 2000).

A hortaliça pode ser infectada em qualquer idade pelo fungo que causa a murcha de fusário, normalmente entra na planta através das raízes jovens e cresce nos vasos de condução de água para caule e partes aéreas, esses vasos são obstruídos, com o bloqueio, a fonte de água é limitada, as folhas começam a murchar com a evolução do processo a planta murcha e morre (MILLER; ROWE, 2008).

Gleason; Edmunds (2006) citam o *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* como o causador da fusariose vascular no tomateiro, as plantas infectadas apresentam amarelecimento e murcha das folhas, o progresso da doença, ocorre acima da base do caule, inicialmente, apenas de um lado da nervura central da folha. Os sintomas se espalham por toda a planta provocando a morte prematura.

2.5.1.1 *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Snyder & Hansen

A murcha-de-fusário é uma das doenças do tomateiro de maior importância e mais amplamente distribuída no mundo, causada pelo *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (ANDRADE et al., 2000) . É uma doença que ocorre em todas as regiões de cultivo do tomateiro e apresenta alguns sintomas principais, como amarelecimento forte, tipo “gema de ovo” nas folhas mais velhas, progredindo para as mais novas. Esses sintomas podem ocorrer num lado da planta ou metade da folha, os folíolos ficam amarelos, murcham e secam, mas permanecem presos no caule, apresentam coloração parda nos vasos lenhosos das folhas e do caule com aparência seca, os frutos não se desenvolvem, ocorrendo muitas vezes quebra prematura e descoloração de vasos (BARRETO; SCALOPPI, 1999).

Alguns meios de controle da doença são utilizados, desde variedades resistentes de tomateiro, que podem não oferecer nenhum grau de controle, o controle químico não é satisfatório, porém os métodos biológicos demonstraram uma estratégia alternativa para controle da doença. Uma variedade de microrganismos no solo tem demonstrado seu potencial como agente de biocontrole contra diferentes espécies do gênero *Fusarium* (MUSLIM, 2003).

2.5.2 Maracujazeiro (*Passiflora edulis* f. sp. *favicarpa* Deneger)

O maracujazeiro pertence à ordem *Parietalis*, família *Passifloraceae*, gênero *Passiflora*, contém aproximadamente 530 espécies tropicais e

subtropicais, onde 150 dessas espécies são originárias do Brasil (DUARTE, 2003).

O maracujá-azedo ou amarelo é uma espécie frutífera da família *Passifloraceae*, é uma trepadeira sublenhosa, glabra de caule cilíndrico e vigoroso. As folhas são trilobadas de margem serrada e com face superior lustrosa. As flores são axilares e solitárias, hermafroditas, brancas com franja roxa, de até 7 cm de diâmetro. O fruto é uma baga globosa, com 5 a 7,5 cm, de seu maior diâmetro, amarelo quando maduro com pericarpo pouco espesso, contendo numerosas sementes ovais, reticuladas, pretas e polpa ácida (PIRES, 2007).

A cultura do maracujá é desenvolvida tipicamente em clima tropical, sendo responsável por 90 % da produção mundial. Atualmente, o Brasil é o maior produtor e o maior consumidor, seguido do Peru, Venezuela, África do Sul, Sri Lanka e Austrália. O maracujá-azedo (*P. edulis* f.sp. *flavicarpa*) ocupa 97 % de área plantada e do volume comercializado em todo país, cerca de 60 % da produção Brasileira de maracujá-azedo é destinada ao consumo “in natura”, em feiras, sacolões e supermercados, e o restante destinados às indústrias de processamento para produção de sucos e outros derivados (FIGUEIREDO., et al 2009).

Em algumas regiões do Brasil, o cultivo comercial de maracujazeiro enfrenta problemas com patógenos de solo que tem provocado sérios prejuízos e até mesmo inviabilizando a cultura em algumas áreas. Ainda não existe uma cultura resistente, sendo desafio para o melhoramento genético. A murcha de *Fusarium* corresponde a uma das principais patologias causadas por patógenos de solo que atacam a cultura do maracujazeiro (BRAGA et al., 2010).

2.5.2.1. *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* Pruss Schlecht

A murcha que afeta a parte aérea da planta, denominada de fusariose do maracujazeiro, é provocada pelo *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae* que se fixa nos vasos do colo da planta impedindo o transporte de água e nutrientes, o que acarreta falência dos órgãos e conseqüentemente a morte. O sistema radicular da planta é afetado com a entrada do patógeno, evoluindo para um

apodrecimento da região do colo, como conseqüência ocorre à decomposição do tronco pela destruição da casca e vasos liberianos, a translocação da seiva é interrompida, ocorrendo então o amarelecimento das folhas mais novas, as mais velhas costumam não apresentar nenhum sintoma, posteriormente ocorre à murcha que pode afetar toda a planta e em poucos dias provocar a morte (FERREIRA, 2009).

São indicadas medidas de controle visando à prevenção da infestação com a utilização de espécies endêmicas adaptadas às condições locais, como maracujá-doce (*P. alata*) ou o maracujá-azul (*P. caerulea* L.) bem como a utilização de linhagens resistentes do maracujá-amarelo, são os eficientes métodos de controle preventivo. A utilização do método de controle biológico com agentes antagonistas é uma ferramenta muito eficaz no combate de diversas doenças, principalmente as causadas por fungos habitantes do solo como o *F. oxysporum* (FERREIRA, 2009).

2.5.3 Abacaxizeiro (*Ananas comusus* L.) Merrill

O abacaxizeiro pertence à Divisão *Angiospermae*, Classe *Monocotyledoneae*, Ordem *Bromeliales*, Família *Bromeliaceae* e Gênero *Ananas*. Das várias espécies do gênero *Ananas*, o *Ananas comusus* (L) Merrill representa todos os cultivares plantados (CASTRO, 1998).

O abacaxizeiro é uma planta herbácea perene pertencente à família *Bromeliaceae* com distribuição em toda a região tropical, com cerca de 3010 espécies distribuídas em 56 gêneros, pode ser encontrado em todos os ecossistemas do Brasil, do nível do mar às regiões montanhosas. O gênero mais importante desta família é o *Ananas*, onde se encontra o abacaxi comestível (BARBOSA, 2009).

Segundo dados da Food and Agriculture Organization of the United Nations-FAO (2008), o Brasil é o maior produtor mundial de abacaxi, respondendo por 14,12 % do total anual produzido no período de 2007. Na segunda posição encontra-se a Tailândia com 12,29 %, seguido da Filipina com 10,06 % (ALVES, 2009).

O abacaxizeiro é composto por um talo ou eixo principal, onde estão apoiados todos os outros órgãos da planta, mede cerca de 25 a 30 cm por 2,5 a 3,0 cm de largura. Apresentam raízes primárias, adventícias e secundárias. As folhas estão inseridas no talo, constituindo um total de 68 a 82 folhas e classificam-se em folhas adultas, localizadas na parte externa e mais novas, situadas no dentro da planta. O fruto é conhecido com infrutescência, fruto composto do tipo seroso, formado por várias flores de uma inflorescência, com todas as flores concrecentes formando uma só unidade carpológica (único fruto). Na sua formação entram um grande número de frutos simples (frutinhos), do tipo baga (NANICA, 2000).

2.5.3.1 *Fusarium subglutinans* f. sp. *ananas* Wollen & Reinking

Os cultivares de abacaxi mais cultivados no Brasil, Pérola e Smooth Cayene, apresentam grande susceptibilidade à fusariose, A doença é causada pelo *Fusarium subglutinans* e caracteriza-se pela exudação de uma substância gomosa que provoca podridão do fruto (ALBUQUERQUE et al., 2000).

A murcha, fusariose ou gomose do abacaxizeiro é responsável por imensos prejuízos provocados aos lavradores de todo o Brasil onde se cultiva essa fruteira, com exceção da Região Norte onde a doença não foi comprovada cientificamente. A doença tem manifestação nos frutos, caule, folhas, pedúnculo e raízes. Nos frutos ocorrem sintomas como a exsudação, principalmente através da cavidade floral, no caule, as lesões ocorrem nas plantas adultas e nas mudas aderentes à planta mãe, as folhas adquirem coloração amarelo-avermelhada e tornam-se flácidas e no pedúnculo da inflorescência, as lesões situam-se nos pontos de inserção das mudas e das folhas (DUARTE, 2003).

O patógeno é capaz de infectar todas as partes da planta, nos frutos ainda verdes observa-se exsudação de goma na superfície dos frutinhos, com uma tendência de amarelecimento precoce. Com a evolução da doença as partes internas dos frutos perdem a rigidez, encolhem-se e tornam-se deformados, em estágios mais avançados de desenvolvimento e maturação, apresentam coloração marron quando infectados e no estágio final, quando

totalmente afetados, ocorre crescimento rosado do fungo. No talo as lesões restringem-se a parte basal, nas plantas adultas as lesões situam-se na parte inferior do caule e na região de inserção das folhas, na área observa-se presença de substância gomosa (KIMATI et al., 2005).

2.5.4 Quiabeiro (*Albemoschus esculentum* L.) Moench

O quiabo é uma espécie oriunda da África e foi mencionada pela primeira vez nos primórdios de 1216 A.C. no Egito. Atualmente encontra-se distribuída pela Ásia, América e Europa (CAMCIUC et al., 1998).

Os países que mais produzem o quiabo são: Índia, Paquistão, Malásia, Sudão, Estados Unidos, México, Antilhas e Brasil. No Brasil, a maior produção encontra-se no estado do Rio de Janeiro, destacando-se a região metropolitana e a baixada litorânea (BAZAN, 2006).

Apresenta excelentes condições para cultivo no Brasil devido a excelentes condições climáticas. Popularmente é cultivado nas regiões nordeste e sudeste, devido a características desejáveis como ciclo rápido, custo de produção economicamente viável, resistência a pragas e alto valor alimentício e nutritivo (MOTA et al., 2002).

O quiabeiro é uma planta arbustiva com crescimento indeterminado, de 0,5 a 2,5 m de altura, de caule ereto, com flores hermafroditas, semilehosa, com cultivo anual em regiões tropicais e subtropicais, bem resistente ao calor e períodos secos, porém o frio provoca abortamento dos frutos jovens, impossibilitando seu cultivo (ARANHA, 2008).

O quiabo é uma importante olerícola, existem várias espécies no mundo, no entanto, a espécie *A. esculentum* é a mais comum. Apresentam boa fonte de vitaminas A, B e C e também carboidratos, proteínas, gorduras, sais minerais, ferro e iodo (SAFDAR et al., 2005).

Apresenta, ainda em sua composição química minerais, proteínas, vitaminas, carboidratos, enzimas e quantidades muito elevadas de mucilagem. Na Índia tem sido colocado como item prioritário para nutrição e saúde (BEGUM et al., 2005).

2.5.4.1 *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (Atk.) Snyder & Hans

O quiabeiro é uma das mais tradicionais hortaliças cultivadas no Estado do Maranhão, estando sempre presente nos pólos produtores, especialmente nas localidades que fazem parte da Ilha de São Luis. Dentre os problemas fitossanitários da cultura, a murcha de fusário, causada por *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* é o mais importante, constituindo um fator limitante da produção (SILVA, 2008).

Os sintomas da fusariose causada pelo *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* são variáveis e dependem do grau de resistência da variedade e das condições ambientais. As plantas afetadas apresentam-se menores, com folhas e capulhos menores, as alterações iniciam-se pelas folhas basais, que amarelecem, secam e caem. Cortando-se o caule e a raiz transversalmente, pode-se notar o escurecimento dos feixes vasculares, neste caso, ocorre obstrução dos vasos pelas estruturas de barreira da planta e presença de micélio e esporos do próprio patógeno, impedindo o livre fluxo da seiva. O quiabeiro é suscetível a raça 6 de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* presente no Brasil e Paraguai (BACCHI et al. , 2001).

Inúmeros produtos naturais de origem vegetal são pesticidas em potencial para controle de doenças fúngicas. Um esforço considerável tem sido realizado a fim de desenvolver novos fungicidas naturais para substituir fungicidas sintéticos e evitar problemas como, toxicidade e resistência a pragas. Esse esforço resultou no uso de extratos de plantas cítricas como fungicidas botânicos. A pesquisa mostrou que os extratos de plantas medicinais, tais como, citros, nim, piretro e algumas ervas, por conter substâncias tóxicas, apresentam grande potencial de produtos naturais para controle de pragas (OKWU et al., 2007).

2.5.5 *Heliconia* (*Heliconia* L.)

As helicônias são plantas de origem neotropical, mais precisamente na região noroeste da América de Sul. O gênero helicônia pertence à família

heliconiaceae com aproximadamente 180 espécies. Cerca de 50 espécies são cultivadas na região Nordeste do Brasil (CASTRO, 1998).

Dentre as flores tropicais cultivadas, estão classificadas cerca de 1.800 espécies pertencentes a oito famílias da ordem Zingiberales. As espécies tradicionalmente cultivadas no Estado do Maranhão são das famílias Musaceae, Heliconiaceae, Zingiberaceae, Marantaceae (ALMEIDA, 1997). Com destaque para as helicônias, cujo mercado tem se tornado cada vez mais convidativo.

A produção de flores e plantas ornamentais encontra-se distribuída principalmente nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais e Rio Grande de Sul, ocupando uma área de 4.500 hectares. Mais de 3.600 produtos respondem por negócios em torno de 350 milhões de dólares. As taxas de crescimento estão em torno de 20 % ao ano. O mercado brasileiro de flores passou de 700 milhões de dólares em 1995, para um valor estimado em 1,3 bilhões de dólares em 1998. Atualmente esse mercado supera cifras de 1,5 bilhões de dólares tanto para varejo como para exportação (SOLOGUREN et al., 2007).

As condições de cultivo das plantas ornamentais tropicais, racionadas a fatores como, precipitação, umidade, temperatura, e densidade de plantio favorecem a ocorrência de doenças, que reduzem a produção e afetam a qualidade das flores com maior incidência na espécie *Heliconia* (SANTOS, 2008).

2.5.5.1 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

No Brasil, estudos sobre problemas fitossanitários de plantas ornamentais tem sido objeto de diversos trabalhos, embora esses estudos, ainda sejam escassos. Dos patógenos relacionados às helicônias, destacam-se os fungos causadores da murcha, como *F. oxysporum* f. sp. *cubense* W.C. Synder & H.N. Hansen (PITTA, 1995).

No plantio de flores tropicais e especialmente em algumas espécies de helicônias, tem sido detectada a murcha de fusário, doença que apresenta um comportamento cosmopolita, e apresenta ocorrência bastante considerável em

várias culturas. O *F. oxysporum* f. sp. *cubense* é um patógeno habitante do solo, encontrado no cultivo de flores tropicais. Em helicônia, esse patógeno, provoca sintomas como amarelecimento progressivo nas folhas mais velhas, murcha, com posterior quebra do pecíolo da folha e pontuações pardo-avermelhadas no pseudocaule e rizoma. A obstrução vascular evolui e pode causar a morte da planta. Este patógeno apresenta grande capacidade de sobrevivência no solo dificultando o controle da doença que basicamente é realizado através de cultivares resistente (CASTRO, 2008).

2.6 Medidas de controle

Medidas de controle citados na literatura para doenças em plantas ornamentais tropicais como manejo da adubação, sistema de plantio e irrigação, muitas vezes não são efetivos. O controle químico tem sido usado de forma empírica, sem qualquer fundamento em pesquisas científicas prévias ou consideração sobre a existência ou não de registro dos produtos utilizados. A utilização de cultivares resistente seria uma alternativa de controle para as principais doenças de flores tropicais (SERRA et al., 2007).

Algumas espécies resistentes e fontes promissoras de resistência têm sido identificadas para emprego em melhoramento vegetal, e tem se apresentado como medida eficiente e econômica no controle da murcha de fusário. A lignina, substância presente na parede celular tem sido indicada como fonte de resistência genética (CASTRO, 2010).

Atualmente tem sido utilizado o extrato de plantas medicinais com propriedades antibióticas como, aroeira (*Schinus molle*), barbatimão (*Sttyphnodendron barbatiman*), caju roxo (*Anacardium occidentale*), alho (*Allium sativum*) e gengibre (*Zenziber officinale*) no controle da fusariose do abacaxizeiro, apresentando-se inócua ao homem e ao ambiente, e com grande potencial de aplicação em um programa integrado de controle de doenças de plantas (CARVALHO et al., 2006).

Os óleos essenciais estão obtendo crescente interesse, são formados por vários compostos voláteis que variam entre as espécies. É difícil associar a atividade antifúngica a compostos isolados ou à classe de compostos, sua

atividade antifúngica está associada à ação sinérgica de muitos compostos (HADIZADEH et al., 2009).

Os óleos extraídos de plantas medicinais como, *Cymbopogon martini*, *Eucalyptus globulos e Cinnamomum zylenicum* foram avaliados quanto a sua atividade antifúngica frente aos fungos *Aspergillus fumigatus* Fresenius e *Aspergillus niger* Tiegh apresentando atividade semelhante ao controle utilizado para fungos como o miconazol. Estes resultados demonstram que os óleos essenciais podem ser utilizados para curar infecções fúngicas, logo podem ter um papel na área farmacêutica e atuar como conservantes (BANSOD et al., 2008).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O presente trabalho tem como objetivo caracterizar e estudar o uso do óleo essencial extraído do fruto da espécie *Pimenta dioica* L. como agente fungicida.

3.2 Objetivos Específicos

- Extrair quantitativamente o óleo essencial dos frutos da *P. dioica* coletados na Cooperativa Agrícola Mista do Projeto Onça LTDA, no município de Taperoá-BA, Brasil.
- Caracterizar fisicamente o óleo essencial.
- Identificar analiticamente os componentes do óleo, usando cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massas, espectroscopia no ultravioleta e infravermelho.
- Avaliar o efeito do óleo essencial dos frutos da *P. dioica* no crescimento micelial de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, *F. subglutinans*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local do Experimento

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Físico-Química e Microbiologia do Pavilhão Tecnológico da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), no Laboratório de Fitopatologia, localizado no Núcleo de Biotecnologia Agrônomo da Universidade Estadual do Maranhão e na Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

4.2 Coleta dos frutos da *P. dioica*

Os frutos foram coletados na Cooperativa Agrícola Mista do Projeto Onça LTDA, no município de Taperoá-BA, Brasil, em Agosto de 2005, recebendo o certificado orgânico pelo Instituto Biodinâmico (IBD) (Apêndice 1). Após a coletas estes foram secos sob ventilação natural, em seguida, triturados com o moinho elétrico (Tecnal, modelo TE-340) e armazenados em recipientes de polietileno.

4.3 Extração do óleo essencial da *P. dioica*

A metodologia adotada envolveu atividades usuais em um tratamento analítico de plantas aromáticas. O óleo essencial foi extraído de 30 gramas de frutos da espécie *P. dioica* L., previamente triturados e secos, com 300 mL de água destilada por hidrodestilação em sistema de Clevenger modificado acoplado a um balão de fundo redondo de 100 mL, para extração do óleo essencial (Figura 4), mantendo-se a temperatura a 100°C com o auxílio de uma manta de aquecimento como fonte de calor. Posteriormente, o óleo foi seco por meio da percolação em Na₂SO₄ anidro. Essas operações foram realizadas em triplicata e as amostras foram armazenadas em frascos de vidro sob refrigeração, para evitar possíveis perdas de constituintes voláteis. Em seguida esses óleos foram submetidos às análises.

O rendimento foi calculado na relação massa/massa pela medida da densidade, observando o volume obtido no próprio sistema de extração.

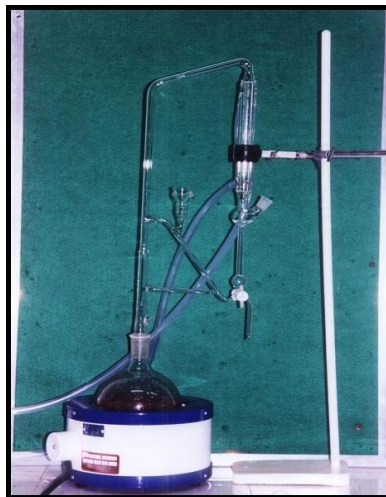


Figura 4. Sistema Extrator de Clevenger.

4.4 Caracterização Física do Óleo Essencial

Na caracterização das propriedades físicas do óleo essencial foram determinadas a densidade, o índice de refração, a solubilidade em etanol a 70 % v/v, cor e aparência.

Para o cálculo da densidade, utilizou-se um balão volumétrico de 1,0 mL, previamente seco, tarado e aferido, onde se adicionaram as amostras do óleo essencial. Na determinação da solubilidade em etanol, utilizou-se uma mistura de álcool/água a 70 % (v/v) mantendo-se constante o volume de óleo e adicionando-se proporcionalmente volumes crescentes da mistura alcoólicas até a sua completa solubilização.

Para obter o índice de refração, foram utilizados tubos capilares de vidro para adicionar as amostras dos óleos diretamente sobre o prisma de Flint do refratômetro de AABE (modelo 2 WAJ), a uma temperatura de 25°C.

Para a determinação da cor e da aparência a técnica proposta é a visual, sendo que a cor foi realizada através da comparação das cores das essências com as cores conhecidas, e a aparência pela comparação das essências no que diz respeito a sua transparência ou limpidez.

4.5 Análises Espectroscópicas

4.5.1 Análise Espectroscópica Vibracional na Região do Infravermelho

Utilizou-se um espectrofotômetro FTIR marca Nicolet modelo 5SXC, equipado com detector TGS na faixa de 4000 a 400 cm^{-1} , utilizando janelas de KBr.

4.5.2 Análise por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectroscopia de Massas

Os óleos essenciais foram analisados por cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massas.

As análises por cromatografia em fase gasosa acoplada ao espectrômetro de massas por impacto de elétrons e analisador íon trap (CG-EM-IE-Íon trap), equipamento Varian 2100, foram realizadas utilizando hélio como gás de arraste com fluxo na coluna de 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; temperatura do injetor: 270 °C, split 1:50; coluna capilar (15m x 0,25mm) com fase estacionária VF-1ms (100% metilsiloxano 0,25 μm) e programação de temperatura do forno de 60 °C a 200 °C com taxa de aquecimento de 8 °C. min^{-1} , e de 200 °C e 290 °C, com taxa de aquecimento de 15 °C. min^{-1} . No Espectrômetro de Massas as temperaturas do manifold íon trap e da linha de transferência foram de 50 °C, 190 °C e 200 °C. Foram injetadas alíquotas de 1 μL (injetor automático CP – 8410) das amostra diluídas na proporção de 20 μL em 1,5 mL de hexano.

4.6 Avaliação do óleo essencial de *P. dioica* sobre as espécies de *Fusarium*.

4.6.1 Obtenção dos Isolados de *Fusarium*

Os isolados de *Fusarium* foram adquiridos da Micoteca do Laboratório de Fitopatologia do Núcleo de Biotecnologia Agrônômico da UEMA (Tabela 1)

Tabela 1. Isolados de *Fusarium* obtidos na Micoteca do Laboratório de Fitopatologia da UEMA.

Espécie	Hospedeiro	Origem
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopercisi</i>	Tomateiro (<i>L. esculentum</i>)	Pedrinhas
<i>F. oxysporum</i> f. sp <i>flavicarpa</i>	Maracujazeiro (<i>P. edulis</i>)	Cinturão Verde
<i>F. subglutinans</i> f. sp <i>ananás</i>	Abacaxizeiro(<i>A. comosus</i>)	Turiaçu
<i>F. oxysporum</i> f. sp <i>vasinfectum</i>	Quiabeiro (<i>A. esculentus</i>)	Quebra-Pote
<i>F. oxysporum</i> f. sp <i>cubense</i>	Heliconia (<i>Heliconia</i> sp.)	Vassoral

Os isolados foram repicados para placa de Petri contendo meio BDA (Batata-Dextrose- Agar), vedadas com filme plásticos e mantidas em temperatura ambiente (25 ± 2 °C) durante sete dias para avaliação do efeito do óleo essencial de *P. dióica* sobre o crescimento micelial dos fitopatógenos.

4.6.2 Efeito inibitório *in vitro* de Óleo essencial de *P. dioica* sobre isolados de *Fusarium*

O óleo essencial de *P. dioica* foi adicionado ao meio BDA fundente na presença de antibiótico na concentração de 1µL/mL. Posteriormente, o meio foi vertido em placas de Petri, previamente autoclavadas. Após solidificação, disco de 6,0 mm de diâmetro contendo micélio de isolados *Fusarium oxysporum*, com 7 dias de idade, foram repicados para o centro de cada placa de Petri, vedadas com filme plástico e mantidas em temperatura ambiente (25 ± 2 °C). Placas contendo meio BDA com o fitopatógeno sem adição do óleo essencial serviram de testemunha.

A avaliação do crescimento micelial foi realizada no 10º dia pela medição do crescimento radial da colônia em dois eixos ortogonais, sendo posteriormente calculada a média. As medidas foram calculadas pela percentagem de inibição do crescimento micelial (P.I.C.). A expressão que determina o cálculo do P.I.C. = $(\text{cresc. Testemunha} - \text{cresc. Tratamento} / \text{cresc. Testemunha}) \times 100$. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x5 (tratamento x patógenos) com quatro

repetições. As médias foram comparadas pelo Teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Características físicas do óleo essencial

Os parâmetros físicos do óleo essencial obtidos de frutos da *P. dioica* foram comparados com dados da obtidos na literatura (Tabela 2).

Tabela 2. Propriedades físicas do óleo essencial extraído de frutos da espécie *P. dioica*.

Propriedades Físico-químicas	Óleo Essencial da <i>P. dioica</i>		
	Dados Analisados	Dados Comparativos	
Densidade (g mL ⁻¹)	0,949*	0,997**	0,980***
Índice de refração (N _D ^{25°})	1,332	1,521	1,525
Solubilidade em álcool a 70% (v/v)	1:2	1:2	1:2
Rendimento(%)	2,8	1,6	2,5
Cor	Amarelo	Amarelo	Amarelo
Aparência	Límpido	Límpido	Límpido

*Barros Júnior (2009)**Mouchreck Filho (2000); ***Valdez Júnior(2009).

Comparando os valores para o óleo essencial dos frutos da espécie *P. dioica* do presente trabalho com os da literatura, pode-se observar que há uma similaridade entre eles, no que diz respeito aos parâmetros analisados. Pequenas diferenças nos valores encontrados podem ser atribuídas a fatores tais como época de coleta, diferentes tipos de solo, condições e tempo de armazenamento dos frutos.

5.2 Análises espectrofotométricas e cromatográficas do óleo essencial dos frutos da espécie *P. dioica*

5.2.1 Análise espectroscópica vibracional na região do Infravermelho

A Figura 5 mostra os espectros do padrão de eugenol (A) e do óleo essencial extraído dos frutos da espécie *P. dioica* L. (B). Comparando o espectro (A) com o espectro (B) foi possível observar que todas as bandas de absorção coincidem na mesma frequência.

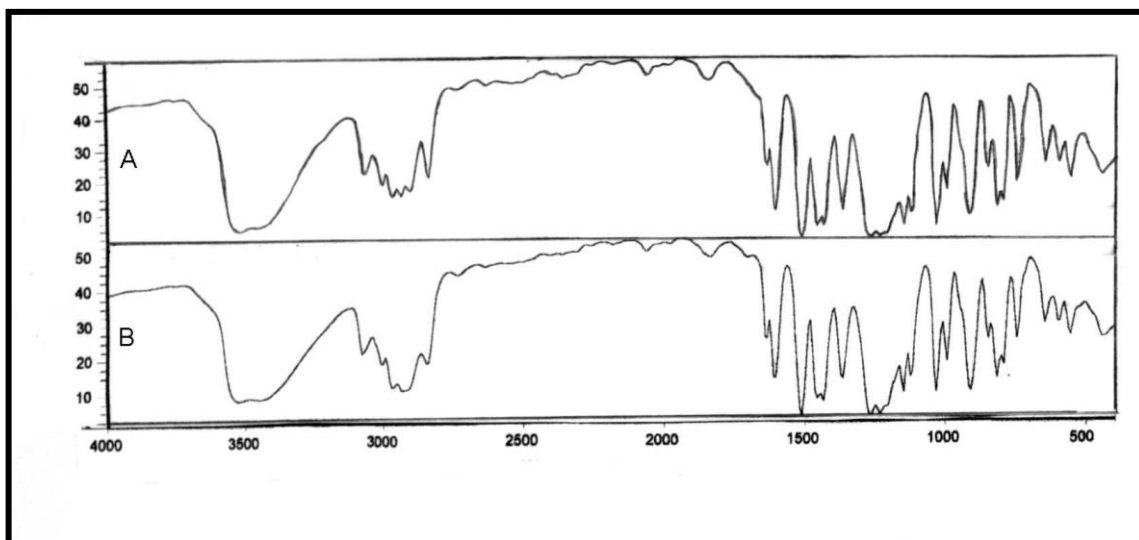


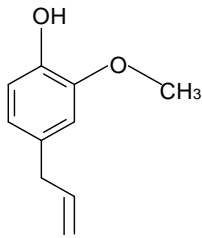
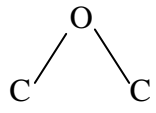
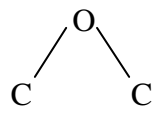
Figura 5. Espectro na região do infravermelho: (A) Padrão eugenol; (B) Óleo essencial.

As fortes bandas de absorção na região de 3500 e 1370 cm^{-1} , nos espectros A e B da Figura 5, são atribuídas aos estiramentos de OH, principalmente devido à presença majoritária do eugenol, confirmado pelo padrão de eugenol (espectro A). As bandas de 2980 e 2920 cm^{-1} são atribuídas a estiramentos C–H e a banda de 3100 cm^{-1} é atribuída a estiramento C–H de aromáticos.

As bandas de 1270 e 1615 cm^{-1} são atribuídas aos estiramentos C–O da ligação C=C, e ao estiramento C–C de aromático (SILVERSTEIN, 2000). Estas observações são bastante justificáveis, visto que, o eugenol é o componente majoritário do óleo essencial da *Pimenta dioica*.

A Tabela 3 apresenta os principais estiramentos do padrão de eugenol e do óleo essencial da *P. dioica*.

Tabela 3. Bandas de absorção e modos vibracionais do padrão de eugenol e do óleo essencial na região do infravermelho.

Composto (Eugenol)	Tipo de Deformação	Grupo Funcional	Tipo de Ligação	Absorção Eugenol (cm ⁻¹)	Absorção Óleo (cm ⁻¹)
	Axial	Hidroxila	O---H	3508,4	3513,5
	Axial	Aromático	C---C	1613,7	1613,6
	Angular	Hidroxila	O---H	1369,8	1372,9
	Plana				
	Axial	Aromática	C---OH	1270,6	1270,5
			Hidroxila		
	Axial	Éter		1234,1	1034,7
	Assimétrica				
	Axial	Éter		1034,9	1034,9
	Assimétrica				
	Axial	Aromático	C---H	3067,9	3073,1
	Axial	Metila	C---H	2970,7	2965,6
	Axial	Alifático	C---C	1450	1451

5.2.2 Cromatografia Gasosa acoplada à Espectroscopia de Massas

O cromatograma do óleo essencial extraído dos frutos da espécie *P. dioica*, obtidos com o uso de uma coluna capilar (15 m x 0,25 mm) com fase estacionária VF-1ms (100 % metilsiloxano 0,25 μ m) LM100 (Figura 6).

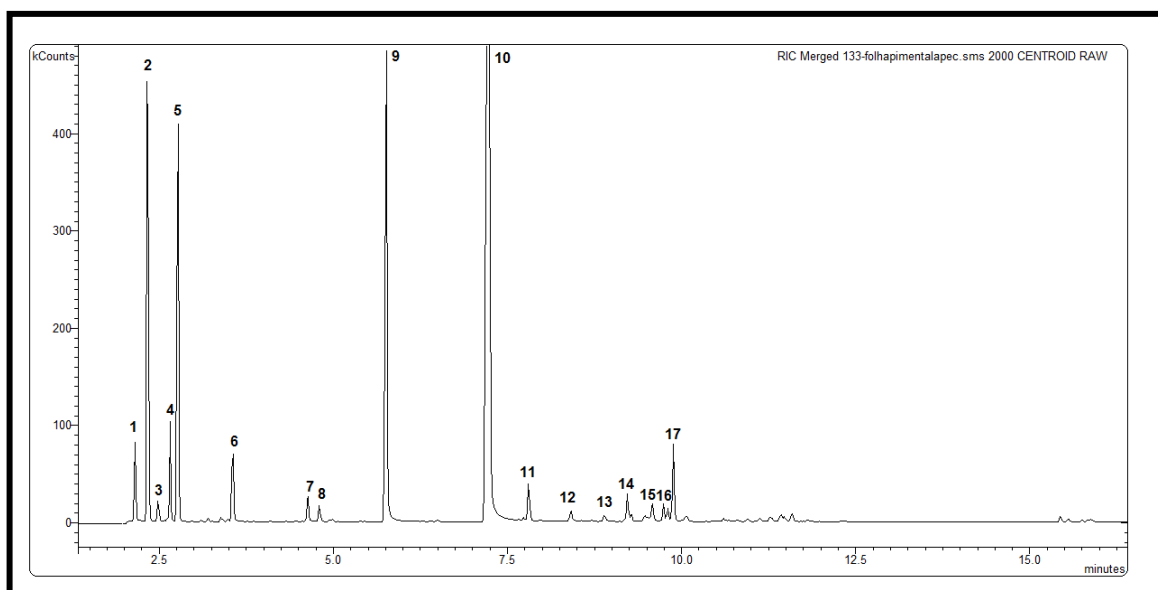


Figura 6. Cromatograma da amostra do óleo dos frutos da *Pimenta dioica*, apresentando os picos selecionados e identificados através da comparação dos respectivos espectros de massas com a espectroteca NIST02.

O pico 10 do cromatograma com tempo de retenção 7,184 min, corresponde ao eugenol. Todos os picos referidos ao cromatograma do óleo essencial dos frutos da *P. dioica* foram identificados por meio de seus espectros de massas.

Os teores dos componentes contidos no óleo essencial são identificados através do espectro de massas da amostra dos frutos da *Pimenta dioica*. É notável o alto teor relacionado ao pico 10 do cromatograma (76,98 %) que posteriormente é identificado como sendo o eugenol, o que evidencia esse composto, como componente majoritário do óleo essencial, como mostra a tabela 4.

Tabela 4. Teor dos componentes identificados através do espectro de massas da amostra dos frutos da *Pimenta dioica*. Onde, Tr=tempo de retenção; Desvpad=desvio padrão.

Pico	Tr (min)	Teor (%)	Desvpad	CV (%)
1(1-octen-3-ol)	2.15	1.40	0.04	2.49
2(β -pinemo)	2.33	6.52	0.08	1.27
3(α -pinemo)	2.49	0.28	0.00	1.79
4(o-cinemo)	2.66	1.94	0.04	1.82
5(limonemo)	2.77	4.09	0.05	1.32
6(linalol)	3.56	0.64	0.02	2.38
7(c.h.s. abinemo)	4.64	0.22	0.01	4.10
8(α -terpinol)	4.80	0.13	0.01	4.23
9(5-indanol)	5.76	5.88	0.20	3.42
10(eugenol)	7.23	76.98	0.32	0.41
11(α -cubebeno)	7.80	0.35	0.01	2.94
12(cariofileno)	8.41	0.09	0.00	3.29
13(α -cariofileno)	8.90	0.08	0.00	0.44
14(γ -muroleno)	9.22	0.25	0.01	2.27
15(α -candineno)	9.58	0.19	0.00	1.53
16(α -muroleno)	9.74	0.22	0.01	4.16
17(δ -candineno)	9.88	0.76	0.01	1.36

Abaixo estão relacionados os espectros de massas dos picos dos componentes majoritários apresentados na Figura 6 e as respectivas propostas de identificação através da comparação com os dados da espectroteca NIST02 e com ADAMS (1995).

Os espectros de massas referente à figura 7 (A) indicam com base na literatura (ADAMS, 1995) e na espectroteca NIST02, a presença no óleo essencial dos compostos β -pineno.

Os picos dos íons moleculares apresentam $m/z=136$, confirmando a fórmula $C_{10}H_{16}$. Os picos de $m/z=93$ para o β -pineno é provavelmente produzido por uma estrutura de fórmula $C_7H_9^+$ formada por isomerização, seguida por clivagem alílica (SILVERSTEIN, 2000).

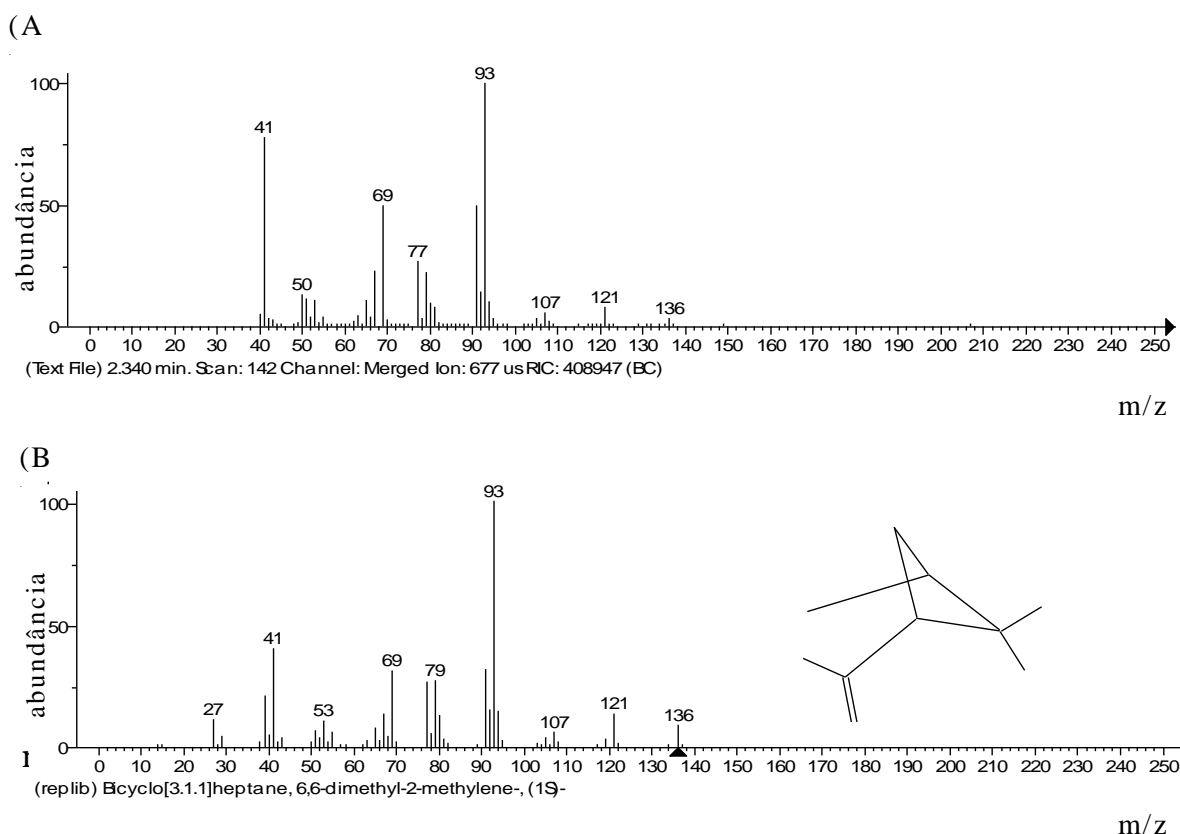


Figura 7. Espectros de massas de (A) composto do pico 2 do cromatograma da Figura 6 e (B) propostas de identificação através da espectroteca NIST02.

O espectro de massas da Figura 8A, identificado como o-cimeno apresenta o pico do íon molecular com $m/z=134$, com fórmula $C_{10}H_{14}$, de baixa intensidade, característico de compostos aromáticos.

O pico de maior intensidade com $m/z = 119$ [M-15] é proveniente da perda de um grupo metila. O pico com $m/z = 91$ (44 %) é característico do cátion tropílio ($C_7H_7^+$) e o pico $m/z = 65$ (9 %) é resultante da eliminação neutra de acetileno(C_2H_2) do íon tropílio.

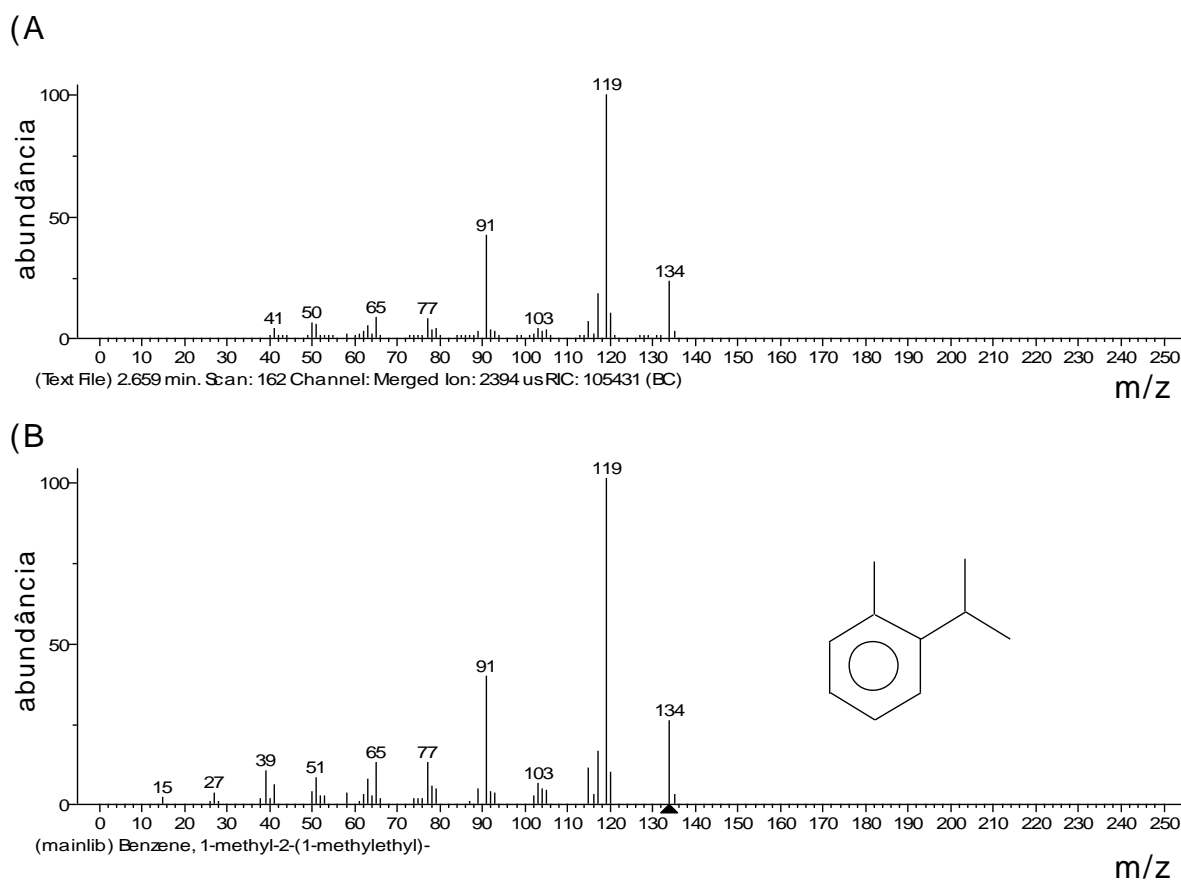


Figura 8. Espectros de massas de (A) composto do pico 4 do cromatograma da Figura 6 e (B) propostas de identificação através da espectroteca NIST02.

O espectro da Figura 9A indica a presença do limoneno no óleo essencial da *P. dioica*. O pico do íon molecular apresenta $m/z=136$ (13 %), o que evidencia a fórmula $C_{10}H_{16}$.

O pico com $m/z = 121$ [M-15] (19 %), confirma a presença de um grupo metila como ramificação. O pico $m/z=93$ (66 %) é provavelmente produzido por uma estrutura de fórmula $C_7H_9^+$.

Alquenos cíclicos, como é o caso do limoneno, apresentam um modo especial de quebra, semelhante a uma reação retro – Diels – Alder com $m/z=68$ (38%) (Figura 10) (SILVERSTEIN, 2000).

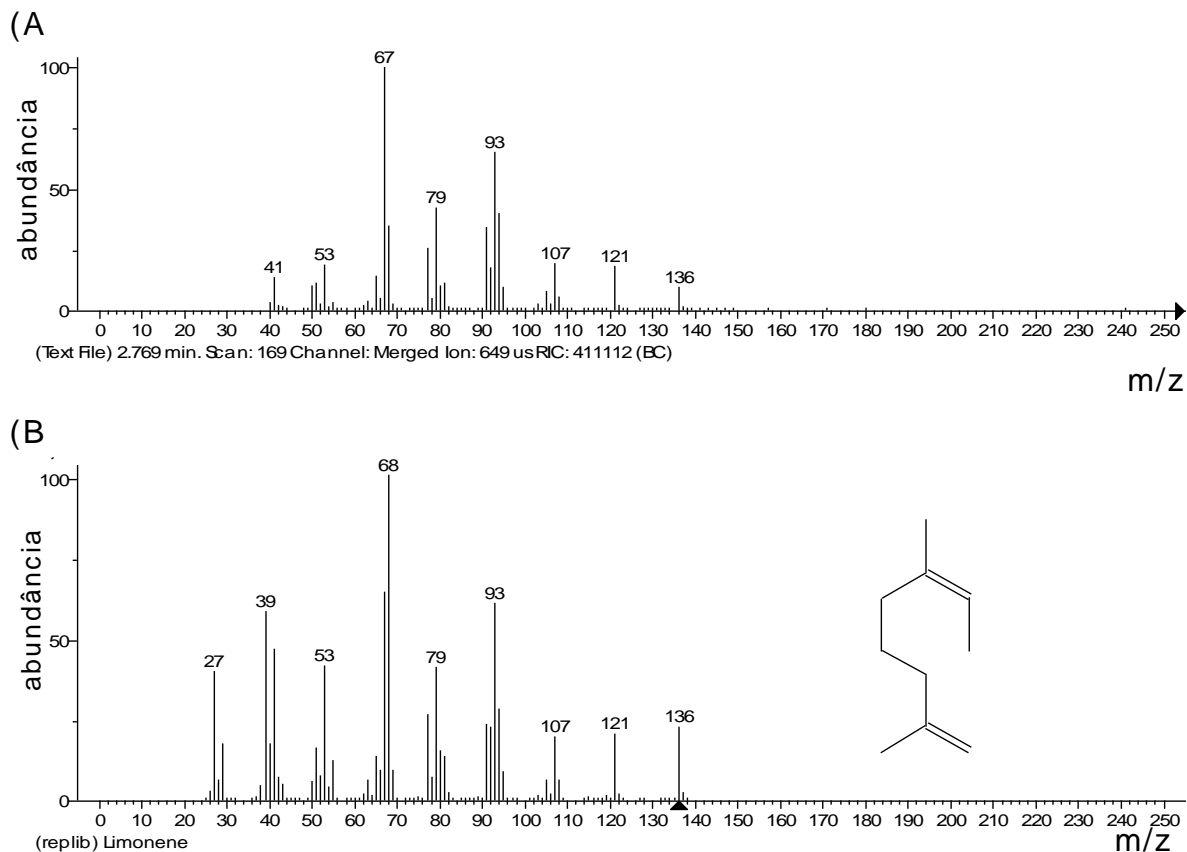


Figura 9. Espectros de massas de (A) composto do pico 5 do cromatograma da Figura 6 e (B) propostas de identificação através da espectroteca NIST02

Reação complementar ao processo de quebra do espectro de massas do limoneno referente ao espectro de massa do Limoneno (Figura 10).

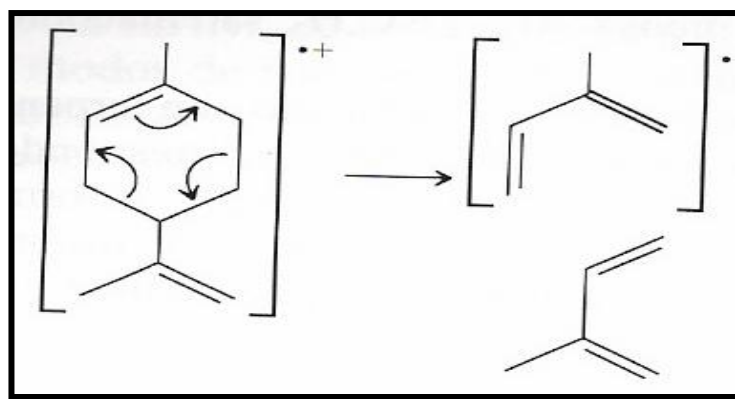


Figura 10. Fragmentação tipo reação *Retro* – Diels Alder do limoneno.

A figura 11 A refere-se ao espectro de massas do 5 – indanol. O pico do íon molecular apresenta $m/z=134$ (84 %), com pico base de $m/z = 133$ [M-1], característico de fenóis substituídos. Um pico de $C_6H_5^+$ em $m/z=77$ (47 %) é usualmente encontrado em fenóis (SILVERSTEIN, 2000).

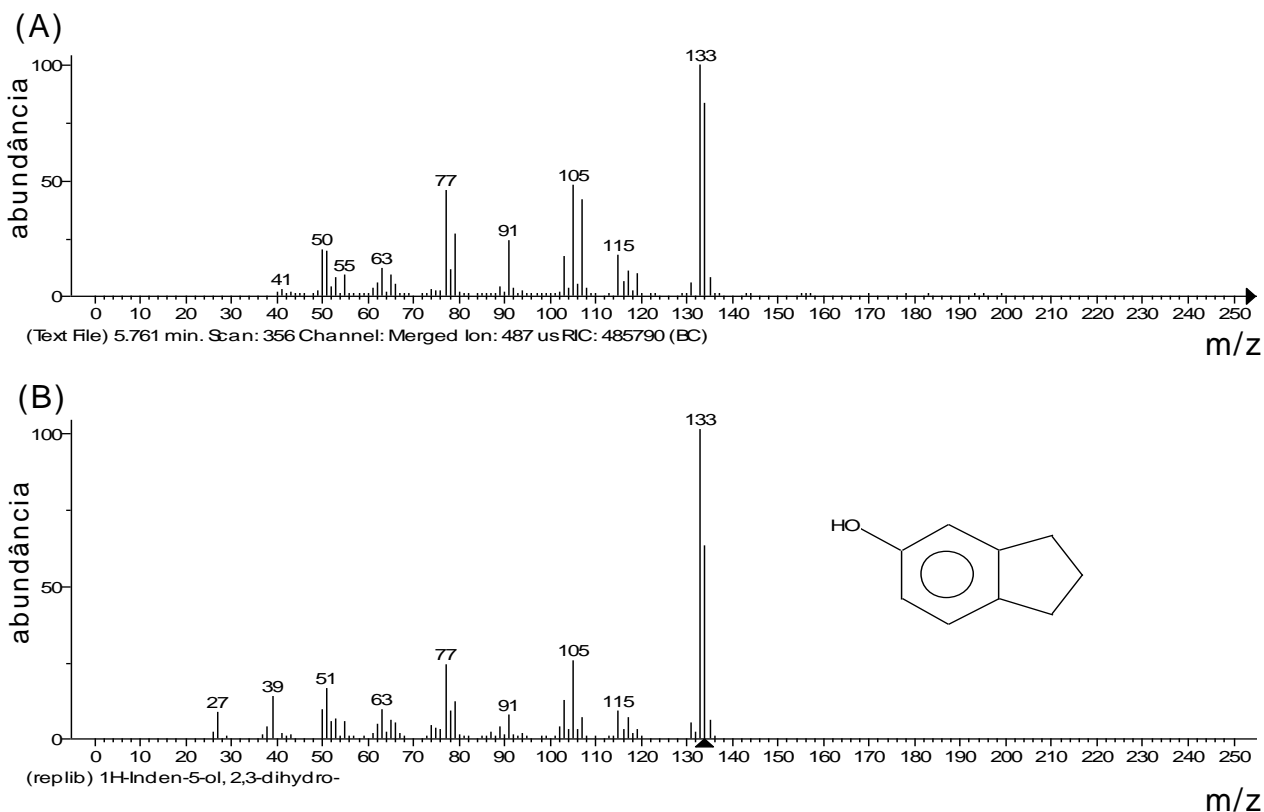


Figura 11. Espectros de massas de (A) composto do pico 9 do cromatograma da Figura 6 e (B) propostas de identificação através da espectroteca NIST02.

A identificação do eugenol por espectrometria de massas, figura 12 (A), pode ser confirmada pelo arquivo da espectroteca NIST02 e por dados constantes na literatura (ADAMS, 1995).

O espectro de massas apresenta o pico do íon molecular $m/z = 164$ [M^+], confirmando como $C_{10}H_{12}O_2$ a fórmula do eugenol. Para fenóis, é comum o pico do íon molecular ser também o pico base, como é o caso do eugenol.

O pico $m/z = 149$ [M-15] (38%) é característico da perda do radical metila ($CH_3\cdot$) e o pico $m/z = 77$ (26%) é característico do íon ($C_6H_5^+$).

Os principais fragmentos apresentados no espectro de massas são 164 (100); 149 (39); 131 (29); 103 (38) e 55 (23), característicos de fenóis e, com base na literatura, picos condizentes com o espectro do eugenol.

Comparando os resultados obtidos pelas quebras e intensidades dos fragmentos do espectro de massas do padrão do eugenol, com o espectro de massas do óleo, foi possível identificar positivamente o eugenol como sendo o principal componente do óleo essencial da *P. dioica*.

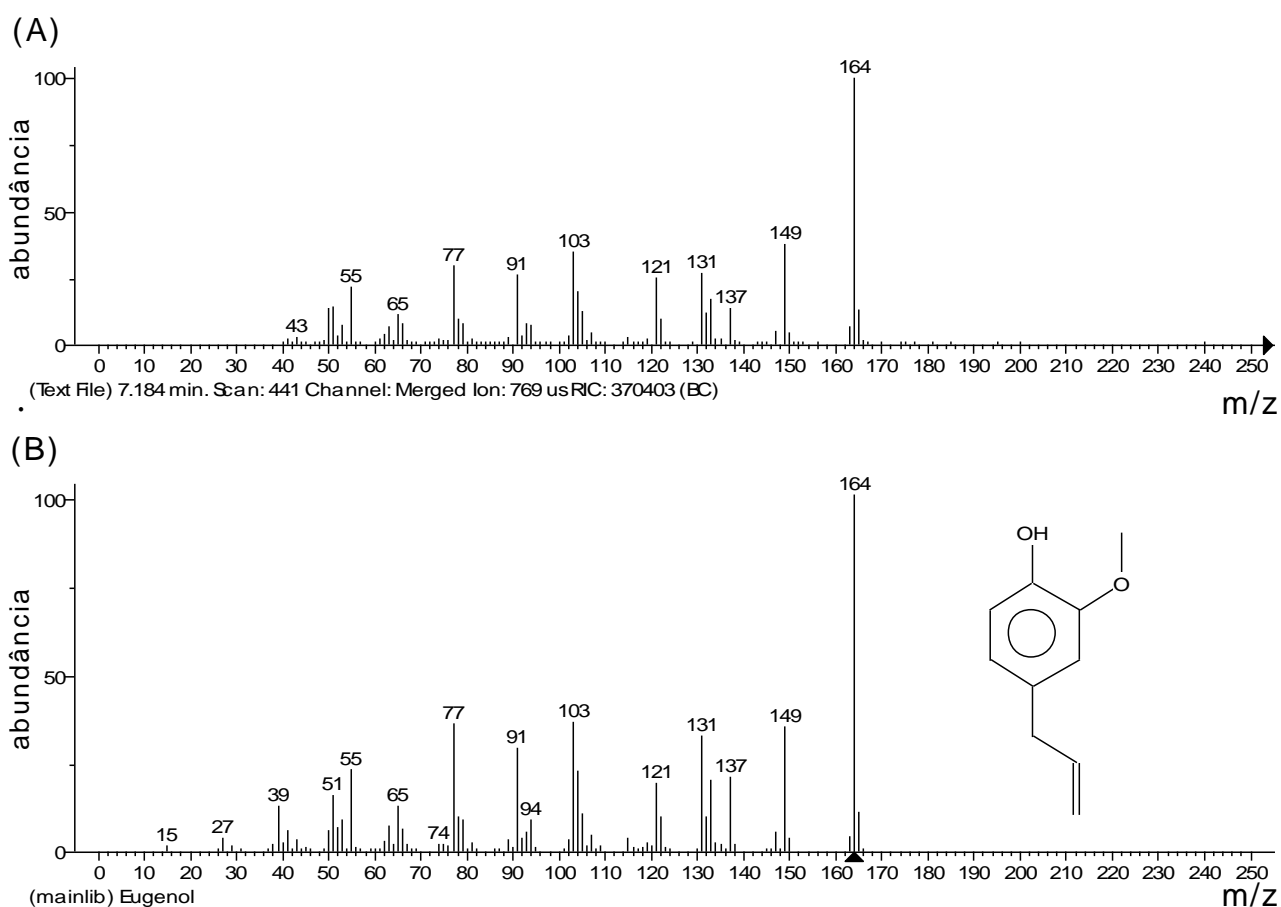


Figura 12. Espectros de massas de (A) composto do pico 10 do cromatograma da figura 7 e (B) propostas de identificação através da espectroteca NIST02.

5.3 Avaliação do efeito do óleo essencial da *P.dioica* sobre diferentes espécies de *Fusarium*

Os resultados observados mostram que o óleo essencial da *P. dioica* na concentração de 1µL/mL em meio BDA promoveu a inibição do crescimento micelial das espécies *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *F.oxysporum* f. sp. *passiflorae*, *F. subglutinans* f. sp. *ananas*, *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e *F. oxysporum* f.sp. *cubense*, quando comparado com as testemunhas, variando 86,67 a 97,78 % de inibição, comprovando-se portanto, o efeito fungicida do óleo essencial (Tabela 5).

Tabela 5. Efeito do óleo essencial de *P. dioica* sobre o crescimento micelial de diferentes espécies de *Fusarium* em meio BDA por 10 dias de incubação a 25 ±2 °C.

Espécies	Diâmetro das Colônias		PIC (%)
	Com Óleo	Sem Óleo	
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	1,20 aB	9,00 aA	86,67
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	0,20 cB	9,00 aA	97,78
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i>	0,35 bcB	9,00 aA	96,11
<i>F. subglutinans</i> f.sp. <i>ananas</i>	0,89 abB	9,00 aA	90,11
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>passiflorae</i>	1,20 aB	9,00 aA	86,67

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tuckey a 5% de probabilidade. CV (%) = 6,63; DMS = 0,13(linhas); DMS = 0,09 (colunas)

No geral, o óleo de pimenta inibiu significativamente o crescimento dos fitopatógenos. Todavia, o *F. oxysporum* f. sp. *cubense* apresentou menor crescimento, de ordem de 0,20 cm, não diferindo do *F. oxysporum* f. sp. *vasifectum*, com inibição de 97,78 e 96,11 %, respectivamente. Ressalta-se que o componente em maior quantidade no óleo essencial de *P. dioica* é o eugenol, pode inferir que essa substância seja responsável pela inibição do crescimento micelial dos fungos do gênero *Fusarium*.

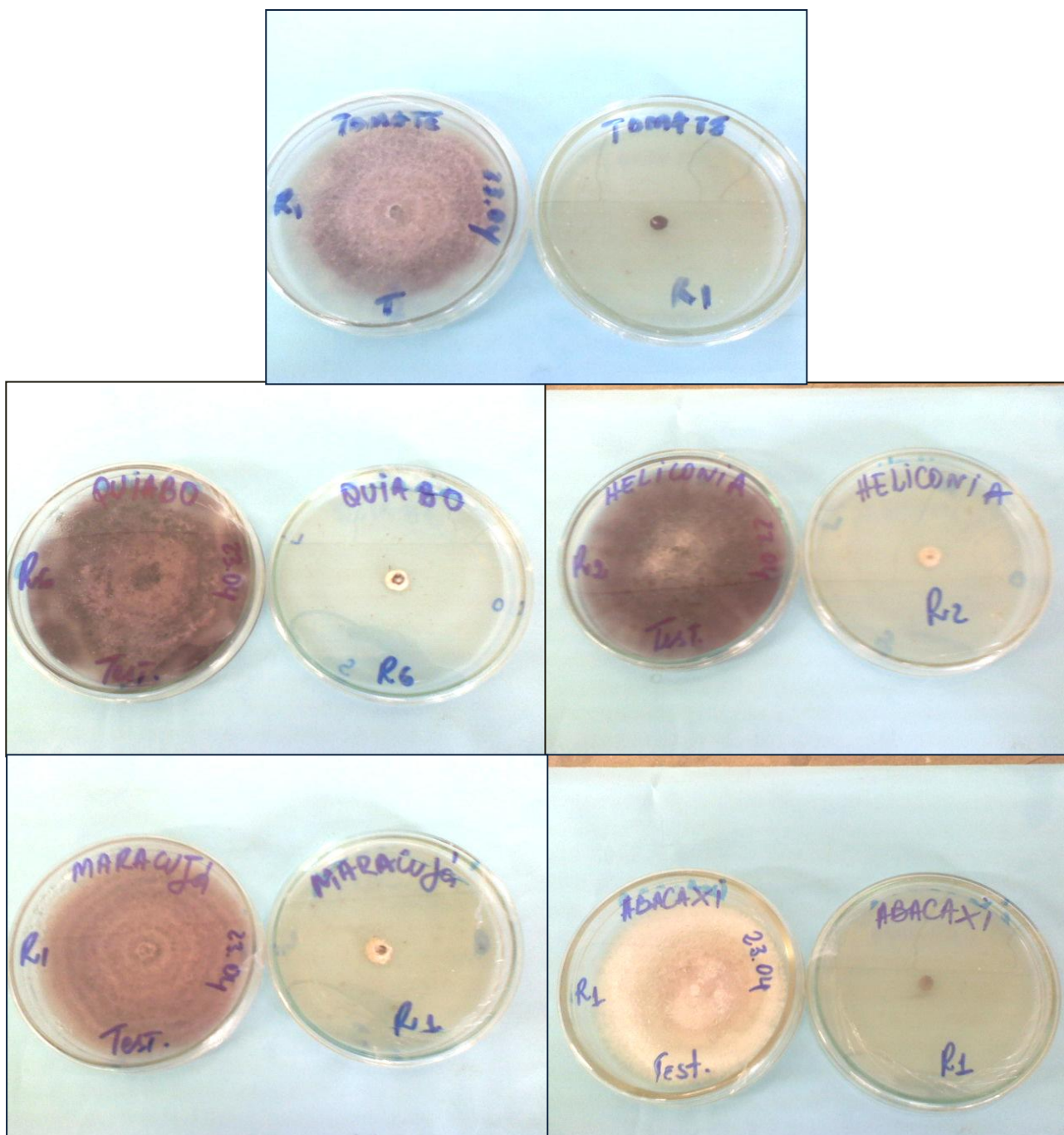


Figura 13. Efeito Inibitório do óleo essencial de *P. dioica* sobre diferentes espécies de *Fusarium* em meio BDA por cinco dias de incubação (25 ± 2 °C).

A mesma ação foi observada por Yunes; Cechiel Filho (2007) que destacam a atividade antifúngica de substâncias isoladas de óleos essenciais, os quais foram descritos: óxido de cariofileno, acetato de cinamila, eugenol, acetato de bornila, cinamaldeído, anetol, benzopropanal, benzaldeído, álcool cinamílico, alfa-terpinol, linalol e gerandial e eugenol. No óleo essencial da *P. dioica* destacou-se o eugenol além de outros compostos de classe química similar atuando como agentes fungicidas.

Trabalhos realizados por Zacarone et al (2009) testando o óleo essencial da pimenta longa (*Piper hispidinervum*) nas concentrações 100, 200, 500, 1000, 1500 e 2000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ sobre fungos fitopatogênicos verificaram inibição total para o *Fusarium oxysporum* na concentração de 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. A análise química do óleo essencial de *Piper hispidinervum* empregando cromatografia em fase gasosa, apresentou o safrol como composto majoritário com 89 % na constituição do óleo essencial. Na análise do óleo essencial de *P. dioica* verificou-se o eugenol como constituinte em maior proporção, 76,98 % inibindo o crescimento micelial de fitopatógenos. O safrol e o metil eugenol são alquilbenzenos (COSTA, 2000).

Resultados similares foram observados por Campaniello (2010) utilizando eugenol como antifúngico em *Fusarium oxysporum* mostrando uma sensibilidade considerável na concentração de 110 a 140 mg/L. Na concentração de 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de óleo essencial da *P. dioica* com eugenol a 76,98 % houve inibição de 86,67 % para o fungo do tomateiro, 97,78 % para o fungo da heliconia, 96,11 % para o fungo do quiabeiro, 90,11 % para o fungo do abacaxizeiro e 86,67 % para o fungo do maracujazeiro.

Em trabalhos realizados por outros autores observou-se a mesma ação inibitória, Christian et al (2007) utilizando óleos essenciais de cravo(*eugenia caryophyllata* L), canela(*Cinnamomum cassia* L), orégano(*oreganum vulgare* L), segurelha(*Satureja Montana* L) e tomilho(*Thymus vulgaris* L) observaram inibição total do crescimento de três patógenos do milho (*Fusarium* spp., *Penicillium* spp. e *Pythium* spp.) com a concentração de 800 $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$. A composição química do óleo essencial do orégano revelou o carvacol (57,3 %), o gama – terpineno (11,4 %), para – cimeno (13,6 %) como compostos majoritários. O óleo de tomilho apresentou p – cimeno (8,94 %), linalol (41,4 %) e lavandulol (10,2 %) como componentes majoritários. O óleo de cravo apresentou uma concentração de eugenol na ordem de (60,6 %) e cariofileno (26,9 %) como os compostos de maior quantidade. Correlacionando com o óleo em estudo, as substâncias identificadas, eugenol e linalol também se encontram na sua constituição, sendo que o eugenol é o contituente em maior percentual, pode-se observar que de acordo com a espécie há uma variação dos compostos químicos e em seu percentual.

Assim como Barrera et al (2009) verificaram atividade antifúngica do óleo essencial do tominho no *Fusarium oxysporum* obtendo inibição total nas concentrações de 100, 150, 200, 250 e 300 ppm. A análise do óleo essencial da *Themus vulgaris*, tominho, revelou os compostos carvacrol, gerandiol e transcinemaldeído com alta atividade antifúngica. O carvacrol, o gerandiol e o transcinemaldeído são fenilpropanóides da mesma classe do eugenol, justificando sua ação antifúngica.

Moleyar; Narasimham(1986) avaliaram quinze componentes do óleo essencial quanto sua atividade antifúngica, destacando-se aldeídos insaturados (aldeídos cinâmicos e citral) e gerandiol que foram os componentes que mais inibiram o crescimento de fungos como, *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum* e *Penicillium digitatum* na concentração inibitória mínima (MIC) de 100mg/mL. A ação de compostos voláteis juntamente com compostos incorporados ao meio provoca em um aumento da ação antifúngica. Quanto à relação estrutura – atividade, o grupo CHO em conjugação com a ligação carbono – carbono (C=C) foi encontrada em muitos casos por ser responsável pela atividade antifúngica da molécula. Em vários compostos presentes na composição do óleo essencial da *P. dioica* foi encontrada ligação C=C, onde podemos também, associar sua ação antifúngica.

5.3.1 Análise da atividade da *P. dioica* sobre o fungo *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*

A tabela 6 apresenta uma interação entre os dez dias de verificação do crescimento micelial da espécie de fungo do tomate, que recebeu o óleo essencial da *P. dioica* na concentração de 1µL/mL de meio de cultura BDA com sua respectiva testemunha, e espécies de fungos que não receberam óleo essencial da *P. dioica*. Destacamos a ação antifúngica do óleo essencial que inibiu o desenvolvimento do micélio nos dez dias de avaliação.

Tabela 6. Efeito do óleo essencial da *P. dioica* sobre o crescimento micelial da espécie *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* em meio BDA após dez dias de incubação a 25 ± 2 °C.

DIA	DIÂMETRO DAS COLÔNIAS	
	com óleo	sem óleo
1	0bC	2,8aG
2	0bC	3,8aF
3	0bC	4,6aE
4	0bC	5,6aD
5	0bC	6,8aC
6	0bC	7,6aB
7	0bC	8,8aA
8	0,5bBC	9,0aA
9	1,2bAB	9,0aA
10	1,2bA	9,0aA
MÉDIA	0,30	6,71

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o teste de Tuckey ao nível de 5% de probabilidade. CV% = 10,8; DMS = 0,43(colunas) representadas por letras maiúsculas DMS = 0,7(linhas), representadas por letras minúsculas.

O óleo essencial da *P. dioica* atua inibindo o crescimento micelial do *F. lycopersici* referente aos dados observados na tabela 6, destaca – se a inibição micelial que ocorre durante oito dias em 100%. com mostra a figura 14.

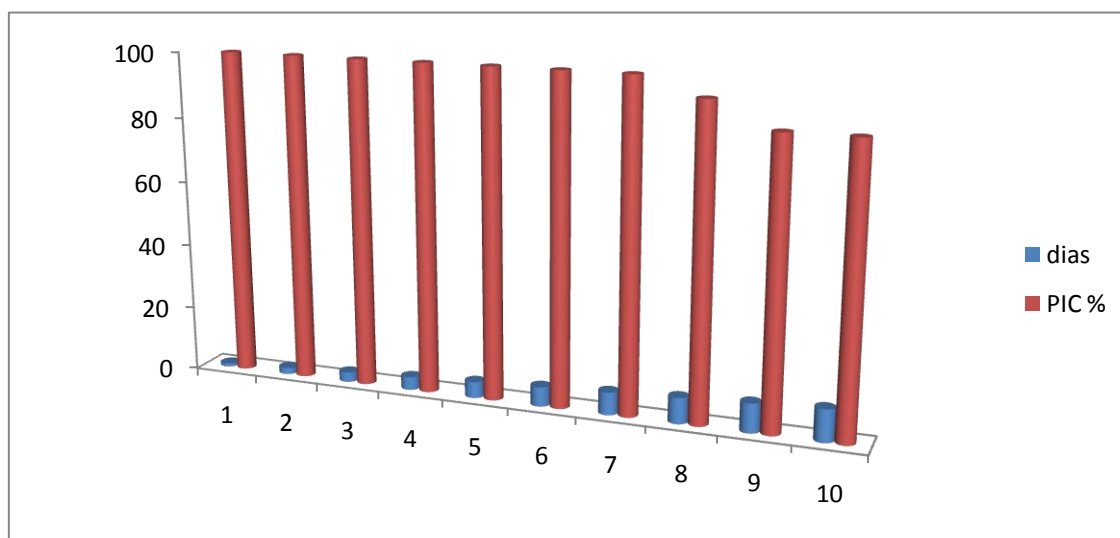


Figura 14. Gráfico do percentual de inibição do crescimento micelial do fungo do tomateiro em meio BDA após a aplicação do óleo essencial da *P. dioica* em dez dias de incubação a 25 ± 2 °C.

Rosset et al (2005) analisaram o extrato etanólico do *Ocimum gratissimum* L. (manjeriço) utilizando a técnica de cromatografia em coluna

de sílica gel eluída com hexano, diclorometano e etanol, obtendo hidrocarbonetos saturados de cadeia longa (C₃₁ – C₃₃ – C₃₄ e C₃₅), eugenol, óxido de cariofileno e uma mistura de estimerol e sitosterol. Verificaram a atividade contra fungos patogênicos no tomate e na cenoura. A ação do óleo essencial da *P. dioica* apresenta o eugenol, componente majoritário inibindo o fungo fitopatogênico *Fusarium* f. sp. *lycopersici* em 86,67 % que ataca o tomateiro.

Wogiatzi et al (2009) testaram o óleo essencial do orégano (*Origanum vulgare* L.) nas concentrações 0, 16, 64, 97, 256 e 610 µL. A concentração 16 µL inibiu o crescimento micelial de importantes fitopatógenos do tomate como o *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, principalmente pelas atividades antifúngicas do carvacrol e timol, em comparação com o óleo essencial da *P. dioica*, essas duas substâncias apresentam estruturas fenólicas do mesmo grupo do eugenol, composto majoritário em sua constituição.

Hadizadeh et al (2009) aplicaram óleos essenciais da urtiga (*Urtiga dióica* L.), tomilho (*Thymus vulgaris* L.), eucalipto (*Eucalyptus spp.*), arruda (*Ruta graveolens* L.) contra fungos fitopatogênicos no tomate, na concentração de 1500 e 2000 ppm obtendo completa inibição. Apenas o tomilho obteve uma inibição variando de 68,5 a 74,8 %. Em comparação aos óleos essenciais testados o óleo da *P. dioica* obteve uma inibição de 86,67 % sobre o *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* na concentração de 1 µL/mL superior que a maioria dos óleos acima citados.

Abdolahi et al (2010) testaram o óleo essencial da Erva Ajowan, semente de orégano, (*Trachyspermum copticum* (L.) Link. contra os fungos *Alternaria alternata* e *Penicilium digitatum* observando-se alta atividade antifúngica no controle de doenças do tomate. A análise espectroscópica da cromatografia apresentou o timol (63%) como componente em maior quantidade. O timol é mais uma substância fenólica, como o eugenol, substância majoritária do óleo essencial da *Pimenta dioica* L com alta atividade antifúngica.

5.3.2 Análise da atividade fungicida da *P. dioica* no fungo *F. oxysporum* f. *sp. cubense*.

A tabela 7 apresenta a avaliação do crescimento micelial do fungo da helicônia (*Fusarium oxysporum* f. *sp. cubense*) com óleo essencial da *P. dioica* na concentração de 1µL/mL e sua respectiva testemunha correlacionando com os dez dias de crescimento micelial.

TABELA 7. Efeito do óleo essencial da *P. dioica* sobre o crescimento micelial da espécie *Fusarium oxysporum* f. *sp. cubense* em meio BDA após dez dias de incubação a 25 °C ± 2 °C.

DIA	DIÂMETRO DAS COLÔNIAS	
	com óleo	sem óleo
1	0bA	3,4,aG
2	0bA	4,3,aF
3	0bA	5,2aE
4	0bA	6,3aD
5	0bA	7,5aC
6	0bA	8,4aB
7	0bA	8,8aA
8	0bA	9,0aA
9	0,15bA	9,0aA
10	0,2bA	9,0aA
MÉDIA	0,042	7,11

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o teste de Tuckey ao nível de 5% de probabilidade. CV% = 5,39; DMS = 0,22 (colunas) representadas por letras maiúsculas DMS = 0,36(linhas), representadas por letras minúsculas.

O óleo essencial da *P. dioica* atua inibindo o crescimento micelial do *F. cubense* referente aos dados da tabela 7, onde observamos uma inibição do crescimento micelial em 100% nos sete dias de avaliação como mostra a figura 15.

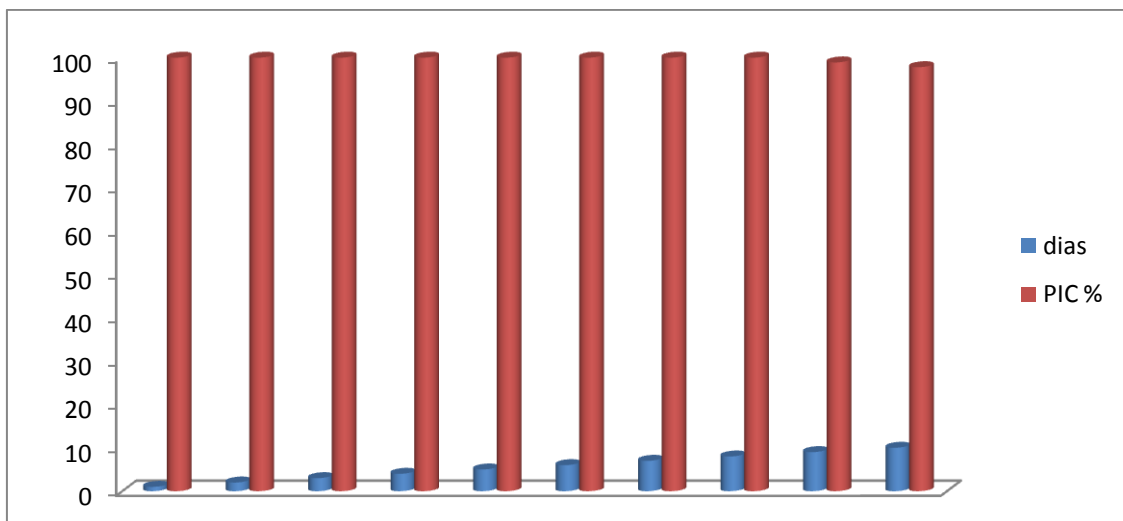


Figura 15. Gráfico do percentual de inibição do crescimento micelial do fungo da Heliconia em meio BDA após a aplicação do óleo essencial da *P. dioica* em dez dias de incubação a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Testes *in vitro* com óleo essencial de *Piper aduncum* L. realizados por Bastos; Bechimol,(2006) no controle de fungos fitopagênicos da helicônia obtiveram inibição total do crescimento micelial na concentração de $100\mu\text{g/mL}$. Em relação ao óleo de *P. dioica* testado nas amostras com o *Fusarium cubense* da helicônia, o resultado foi uma inibição de 97,78 % na concentração de $1\mu\text{L/mL}$.

5.3.3 Análise da atividade fungicida da *P. dioica* no fungo *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*

A tabela 8 apresenta a avaliação do crescimento micelial do fungo do quiabo (*Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*) com óleo essencial da *Pimenta dioica* L na concentração de $1\mu\text{L/mL}$ e sua respectiva testemunha correlacionando com os dez dias de crescimento micelia

TABELA 8. Efeito do óleo essencial da *P. dioica* sobre o crescimento micelial da espécie *Fusarium oxysporum* f. sp *vasinfectum* em meio BDA após dez dias de incubação a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

DIA	DIÂMETRO DAS COLÔNIAS	
	com óleo	sem óleo
1	0bA	2,8aH
2	0bA	3,7,aG
3	0bA	4,7aF
4	0bA	5,9aE
5	0bA	6,7aD
6	0bA	7,6aC
7	0bA	8,6aB
8	0,35bA	9,0aA
9	0,35bA	9,0aA
10	0,35bA	9,0aA
MÉDIA	0,1	6,7

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o teste de Tuckey ao nível de 5% de probabilidade. CV% = 6,2; DMS = 0,24(colunas) representadas por letras maiúsculas DMS = 0,4(linhas), representadas por letras minúsculas.

O óleo essencial da *P. dioica* atua inibindo o crescimento micelial do *F. vasinfectum* referente aos dados apresentados na tabela 8. Destaca-se a inibição do crescimento micelial em torno de 96,1 %.

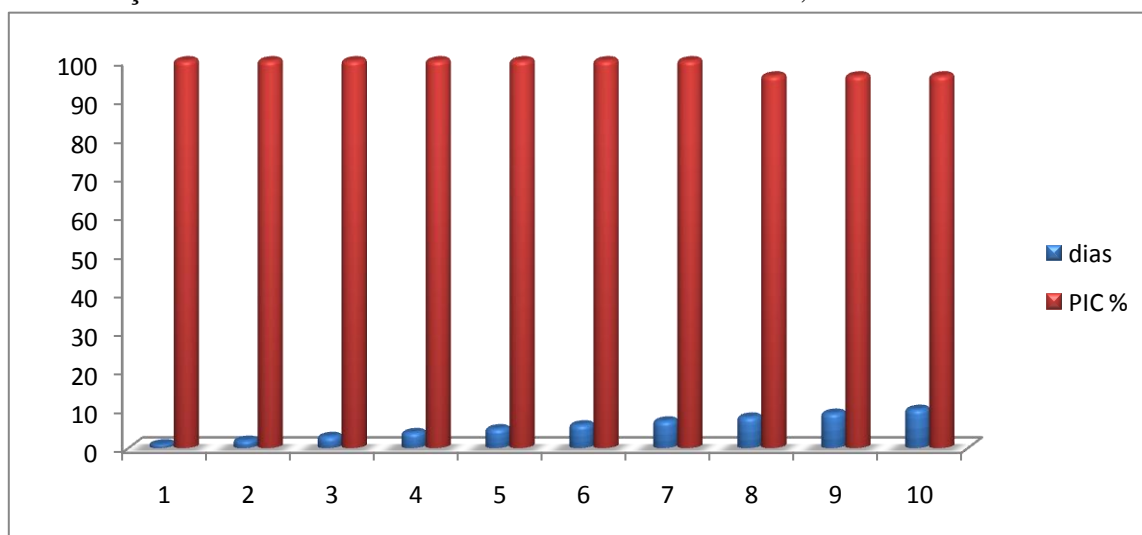


Figura 16. Gráfico do percentual de inibição do crescimento micelial do fungo do Quiabeiro em meio BDA após a aplicação do óleo essencial da *P. dioica* em dez dias de incubação a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Huang et al (2010) Identificaram produtos naturais para controle de doenças em plantas. Foi utilizado o óleo essencial do fruto *Anis estrelado*, que por hidrodestilação foi analisado por cromatografia gasosa (GC) e cromatografia gasosa/espectroscopia de massa (GC-MS). Os componentes

identificados foram, Trans – anetol (89,5 %), 2(1ciclopentenilo) – furano (0,7 %) e cisanethole (0,7 %) foram considerados os mais importantes entre os 22 compostos identificados que constituem 94,6 % do óleo essencial. A atividade antifúngica do óleo essencial e do trans – anetol, tanto um quanto o outro exerceram forte atividade antifúngica contra fungos fitopatogênicos. A atividade antifúngica do óleo essencial no *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* obteve uma inibição micelial de 92,50 % na concentração de 1mg/mL. No estudo realizado com o *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* a inibição micelial pelo óleo da *P. dioica* correspondeu a 96,11 % com uma concentração de 1 μ L/mL, tendo o eugenol como componente majoritário.

A murcha de fusário do quiabeiro foi tratada com óleo de cravo, óleo de canela, óleo de mostarda e extratos botânicos por Brower; Locke (2000). A densidade populacional do *F. vasinfectum* foi determinada nos tempos 1, 3, 7, 14 e 21 dias. O óleo do cravo, da canela, da mostarda e extratos botânicos inibiu o crescimento micelial em 97,5%, 96,1% e 99,9%. No presente trabalho, o *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* foi tratado com o óleo da *P. dioica* na concentração de 1 μ L/mL com inibição micelial de 96,11 %

A composição química do óleo essencial de flores de *Metasequonia glyptostroboides* Miki ex Hu foi analisada por hidrodestilação e GC – MS, por Bajpai et al (2007) identificando 59 compostos, os de maior proporção são, α – pireno (29,54 %), óxido de cariofileno (4,49 %), α – thujene (8,63 %), bornylene (8,63 %), tartarol (5,28 %), β – cariofileno (4,49 %), δ – 3 – careno (3,19 %), 2 – β – pireno (2,25 %) e α – humuleno (1,18 %). O óleo foi aplicado em fungos, *F. vasinfectum*, inibindo o crescimento micelial entre 49 a 70%. Os compostos α – pireno (0,28 %), óxido de cariofileno (0,09 %), 2 – β – pireno (6,52 %), foram encontrados no óleo essencial da *P. dioica* em seus respectivos teores e em conjunto com outros compostos inibiram o *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* em 96,11 %

5.3.4 Análise da atividade antifungica da *P. dioica* no fungo *F. subglutinans*.

A tabela 9 apresenta a avaliação do crescimento micelial do fungo do abacaxi (*Fusarium subglutinans*) com óleo essencial da *P. dioica* L na concentração de 1 μ L/mL e sua respectiva testemunha correlacionando com os dez dias de crescimento micelial.

TABELA 9. Efeito do óleo essencial da *P. dioica* sobre o crescimento micelial da espécie *Fusarium subglutinans* em meio BDA após dez dias de incubação a 25 °C \pm 2 °C.

DIA	DIÂMETRO DAS COLÔNIAS	
	com óleo	sem óleo
1	0bB	3,1aG
2	0bB	4,0aF
3	0bB	5,0aE
4	0bB	6,3aD
5	0bB	7,3aC
6	0bB	8,0aB
7	0bB	8,8aA
8	0,16bB	9,0aA
9	0,54bAB	9,0aA
10	0,9bA	9,0aA
MÉDIA	0,16	6,95

Foi aplicado o teste de Tuckey ao nível de 5% de probabilidade. DMS = 0,38(colunas) representadas por letras maiúsculas DMS = 0,61(linhas), representadas por letras minúsculas.

O óleo essencial da *P. dioica* atua inibindo o crescimento micelial do *F. subglutinans* referente aos dados da tabela 9, com inibição micelial em 100 % nos sete primeiros dias e com inibição de 90 % no décimo dia.

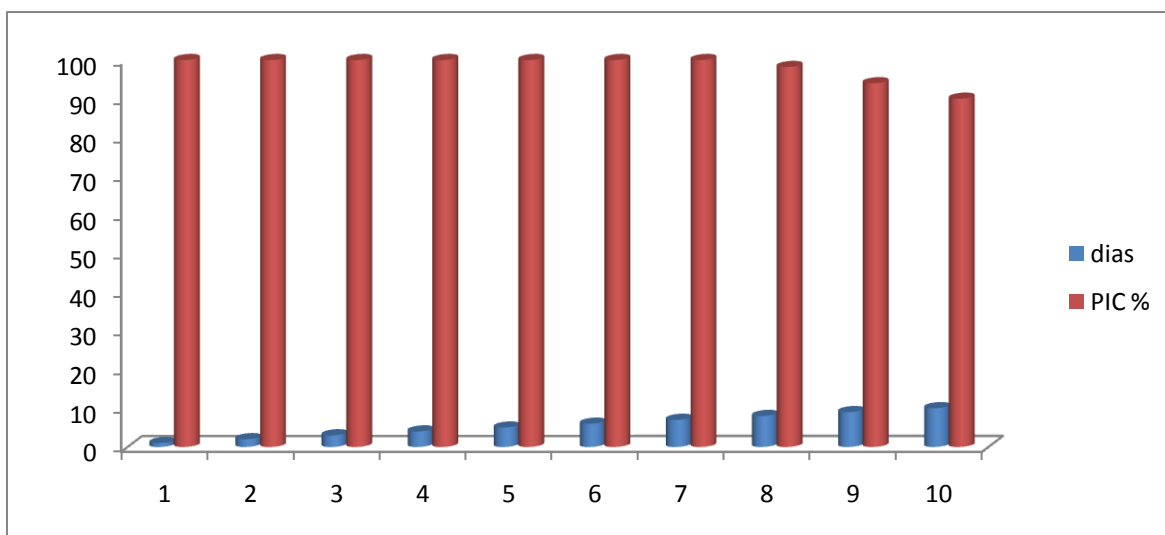


Figura 17. Gráfico do percentual de inibição do crescimento micelial do fungo do Abacaxizeiro em meio BDA após a aplicação do óleo essencial da *P. dioica* em dez dias de incubação a 25 °C \pm 2 °C.

Garcia et al (2008) testaram cinco monoterpenos (citral, citronelal, l-carvona, isopulegol e α - pireno) como antifúngicos para impedir o crescimento micelial e a germinação de conídios do *Fusarium subglutinans*, obtendo uma considerável inibição do crescimento do micélio e indicando o citral como altamente eficaz no controle de fungos fitopatogênicos. Dos constituintes testados o α - pireno encontra-se entre os compostos do óleo essencial da *P. dioica* no percentual de 0,28 % inibindo o crescimento micelial do *Fusarium subglutinans*.

5.3.5 Análise da atividade fungicida d.a *P. dioica* no *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae*

A tabela 10 apresenta a avaliação do crescimento micelial do fungo do maracujá (*Fusarium oxysporum* f. sp *passiflorae*) com óleo essencial da Pimenta dióica L na concentração de 1 μ L/mL e sua respectiva testemunha correlacionando com os dez dias de crescimento micelial.

Tabela 10. Efeito do óleo essencial da *P. dioica* sobre o crescimento micelial da espécie *Fusarium oxysporum* f. sp *passiflorae* em meio BDA após dez dias de incubação a 25 °C \pm 2 °C.

DIA	DIÂMETRO DAS COLÔNIAS	
	com óleo	sem óleo
1	0bC	3,1aG
2	0bC	4,0aF
3	0bC	5,0aE
4	0bC	6,3aD
5	0bC	7,3aC
6	0bC	8,0aB
7	0bC	8,8aA
8	0,42bB	9,0aA
9	0,42bB	9,0aA
10	1,2bA	9,0aA
MÉDIA	0,2	6,86

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o teste de Tuckey ao nível de 5% de probabilidade. CV% = 4,0; DMS = 0,16(colunas) representadas por letras maiúsculas DMS = 0,27(linhas), representadas por letras minúsculas.

O óleo essencial da *P. dioica* atua inibindo o crescimento micelial do *F. passiflorae* referente aos dados da tabela 10. onde destaca-se 100 % de inibição nos sete dias iniciais e 86,6 % no décimo dia.

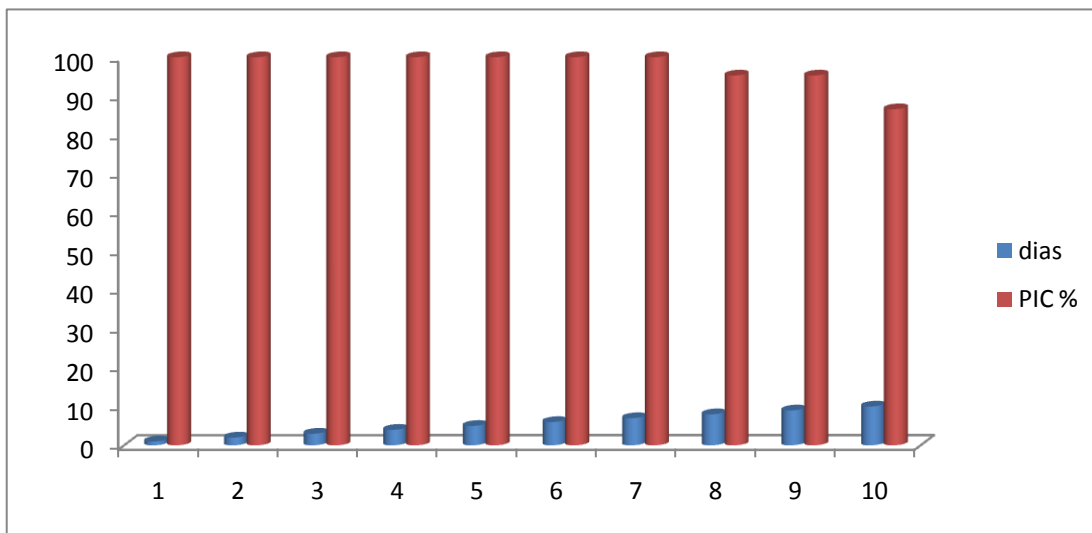


Figura 18. Gráfico do percentual de inibição do crescimento micelial do fungo do Maracujazeiro em meio BDA após a aplicação do óleo essencial da *P. dioica* em dez dias de incubação a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Foi verificado por Souza Junior et al (2009) o efeito fungitóxico de óleos essenciais de plantas pimenta-alecrim (*Lippia sidoides*), manjerição (*Ocimum gratissimum*), eucalipto (*Lippia citriodora*) e capim-limão (*Cymbopogon citratus*) sobre o fungo fitopatogênico *Colletotrichum gloeosporioides* do maracujazeiro amarelo obtendo uma inibição do crescimento micelial do fungo em 100%. A análise do óleo essencial revelou o eugenol como maior constituinte, com percentual de 73,3%. Relacionando com os constituintes do óleo essencial da *P. dioica*, o eugenol também é o constituinte em maior proporção e inibe o crescimento micelial do *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* em 100%.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Algumas conclusões podem ser enumeradas a partir do presente trabalho, conforme apresentadas a seguir:

1. O estudo dos métodos de extração do óleo essencial possibilitou verificar os melhores parâmetros para o processo extrativo em função do melhor rendimento e da concentração de eugenol;
2. A espécie *Pimenta dioica*, forneceu um óleo essencial cujo rendimento foi de 2,8 % (m/m), o qual foi considerado de valor elevado em relação à extração de outros óleos essenciais de plantas aromáticas; Os estudos das constantes físicas do óleo essencial apresentaram valores semelhantes aos valores obtidos pela literatura e pelos padrões, usados para as suas comparações;
3. A atividade antifúngica do óleo essencial da *Pimenta dioica* L nas espécies *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae*, *Fusarium subglutinans*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e *Fusarium* f. sp. *cubense* mostrou-se altamente eficaz, com uma inibição de 100 % de todas as espécies testadas.
4. O óleo essencial da *Pimenta dioica* L na concentração de 1µl/mL agiu como um potente fungicida no combate a fungos prejudiciais às culturas do tomateiro, maracujazeiro, quiabeiro, abacaxizeiro e helicônia, o que nos permite recomendar o seu uso como forma biodegradável de se combater fungos fitopatogênicos.
5. Pesquisas adicionais são necessárias para encontrar uma concentração mais econômica e racional de uso do óleo essencial da *Pimenta dioica* L e conseqüentemente estender sua ação frente a outros fungos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDOLAH, A.; HASSANI, A.; GHOSTA, Y.; JAVADI, T.; MESSHKATALSADAT, M.H. Essential oils as control agents of postharvest *Alternaria* and *Penicilium* rots on tomato fruits. **Journal of Foods Safety**, v.30, n.2, p.341 – 352, 2010.
- ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy**. Illinois: Allured, 1995. p. 118.
- AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. 5 ed. San Diego: Academic Press, 2005. 922p.
- ALBUQUERQUE, C.C.; CAMARA, T.R.; MENEZES, M.; WILLADINO, L.; MEUNIER, I.; ULISSES, C. Cultivo in vitro de ápices caulinares de abacaxizeiro para limpeza clonal em relação a fusariose. **Scientia Agricola**. v.57, n.2, p.363 - 366, 2000.
- ALEXPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. New York: John Willey & Sons, 1996, 865p.
- ALMEIDA, I.M.G.; MALAVOLTA JR., V.A.; IMENES, S.L. **Problemas Fitossanitários em Plantas Ornamentais**. Campinas. Instituto Biológico, 1997, 109p.
- Allspice (*Pimenta dioica*) Disponível em <http://www.soupsong.com/fallspic.html> Acesso 18 abr. 2004
- ALVES, M. Z. , **Epidemiologia da podridão negra do abacaxi e efeito de extratos vegetais no manejo da doença**. Recife, 2009. 61p. Dissertação de (Doutorado) - Universidade Federal de Pernambuco,
- ANDRADE, D.E.G.T. & MICHERE, F. S. J. Incidência da murcha de fusário do tomateiro no agreste de Pernambuco e determinação no tamanho da amostra para quantificação da doença. **Fitopatologia Brasileira**. n.25, p. 36 – 41, 2000.
- ASTA on line. Allspice. Disponível em: <<http://www.astaspice.org/index.cfm>> Acesso em: 17 mar. 2009.
- ATRASSO. Disponível em:<[HTPP.www.globorural.globo.com/edic/185/rep_tradição9.html](http://www.globorural.globo.com/edic/185/rep_tradição9.html)> Acesso em jul.2010.

- ARANHA, S.A. **Mosaico do quiabeiro: Etiologia, caracterização molecular, biologia e diversidade genética do patógeno**. Brasília, 2008. 85p. Dissertação (Mestrado). Universidade de Brasília.
- BACCHI, L. M. A. ; GOULART, A.C.P. ; DEGRANDE, R. **Doenças no solo**. Revista Cultivar, n. 32, p. 25 – 29, 2001.
- BAJPAI, V.K.; RAHMAN, A.; KANG, S.C. **Chemical composition and antifungal properties of the essential oil and extracts of *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu**. Industrial Crops and Products. v.26, p. 28 – 35,2007.
- BANSOD, S. and RAI, M. Antifungal activity of essential oils from India Medicinal Plants against human pathogenic *Aspergillus fumigates* and *Aspergillus niger*. **World Journal of Medicinal Sciences** n. 2, p. 81 – 88, 2008.
- BARBOSA, M.C.,**Avaliação de ácido β -naftoxiácético, ácido nodolbutírico e ácido giberélico na morfogênese de microplantas de abacaxizeiro gomode-mel**. Piracicaba, 2009. 74p. Dissertação (mestrado). Escola de Agricultura Luis de Queiroz.
- BARIK, B.P.; TAYUNG, K.; JAGADEV, P.N.; DUTRA, S.K.; Phylogenetic placement of an endophytic fungus *Fusarium oxysporum* isolated from acorus calamus rhizomes with antimicrobial activity. **EJBS** v.2, p. 8 – 16, 2010.
- BARRETO, M.; SCALOPPI, E.A.G. **Doenças do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill)**.Boletim Técnico(atualizado em 1999). Disponível em: <http://www.agroalerta.com.br/tomateiro.htm>. Acesso em 17 ago.2010
- BARRERA-NECHA, L.L.; GARDUNO-PIZANA, C.; GARCIA-BEZERRA, L.J. In vitro antifungal activity of essential oils and their compounds on mycelia growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* (Massey) Snyder and Hansen. **Journal of Nutrition** v.8, p. 17 – 21, 2009.
- BASTOS, C.N.; BENCHIMOL, R.L. **Avaliação do óleo essencial de *Piper aduncum* L. sobre o crescimento micelial de patógenos de plantas ornamentais**. In; Congresso Brasileiro de Defensivos Agrícolas Naturais. Belém, PA, Embrapa Amazônia Oriental n.29, p.555 – 557, 2006.

- BAZAN, U.R. **Avaliação de germoplasma de quiabeiro (*Abelmoschus esculentum*) quanto à resistência ao oídio (*Erysiphe cycloracearum*).** Botucatu, 2006. 59p. Dissertação (Mestrado) 2006. 59p. Faculdade de Ciências Agronômicas da Unesp.
- BEGUN, M. ; LOKESH, S. ; RAVISSHANKAR, R.V. ; SHAILAJA, M. D. ; KUMAR, T.V.; SHEITTY, H. S. Evaluation of certain storage conditions for pathogens. okra (*Abelmoschos esculentus* (L.) Moench) Seeds against potential fungal. **International Journal of Agriculture & Biology**. n. 4, p. 550 – 554, 2005.
- BROWER, J.H.; LOCKE, J.C. Effect of botanical extracts on the population density of *Fusarium oxysporum* in soil of *Fusarium wilt* in the greenhouse. **Plant Disease** n. 84, p. 300 – 305, 2000.
- BRAGA, M.F.; SANTOS, C.E.; VILELA, N.T.; TORRES, A.A.; SOUSA, C.; FALEIRO, F.G.; RESENDE, L.N.; JUNQUEIRA, K.P. Enraizamento de estacas de três espécies de Passiflora. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.28, n.2, p. 612 – 617, 2010.
- BUDZIKIEWICZ, H.; DJERSSAI, C.; WILLIAMS, D.H. **Structure elucidation of natural products by mass spectrometry. II: Steroids, Terpenoids, Sugars and Miscellaneous class.** Amsterdam: Holden-Day, 1964. 306p
- CAMCIUC, M.; DEPLAGNE, M.; VILAREM, G.; GASET, A. Okra *Abelmoschus esculentus* L. (Moench) a crop with economic potential for set aside acreage in France. **Industrial crops and products**. v.7, n.5, p. 257 – 264, 1998.
- CAMPANIELLO, D. Antifungal activity of eugenol against *Penicillium*, *Aspergillus* and *Fusarium* species. **Journal of Food Protection**. v.73, p. 1124 – 1128, 2010.
- CARVALHO, R.A. ; LACERDA, J.T.D. ; OLIVEIRA, E.F. ; CHOARY, S.A. ; BARBEIRO NETO, M. ; SANTOS, E.S. **Controle Agorecológico da fusariose do abacaxi com plantas antibióticas.** 2006. Artigo em hipertexto. Disponível em: <Http://www.infobios.com/artigos/2006/abacaxi/index.htm>. Acesso em 20 set. 2010.

- CASTRO, P. R. C. **Ecofisiologia de fruteiras tropicais: Abacaxizeiro, maracujazeiro, mangueira, bananeira e cacaueiro**. Ed. Palma, p. 13 -14, 1998.
- CASTRO, N. R. ; COELHO,R.S.B. ; LARANJEIRA, D. ; COUTO, E. F. ; SOUZA, M. B. R. Ocorrência, métodos de inoculação e agressividade de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* em *Helicônia* spp. **Summa Phytopathologica**, v.34, n.2, p.127 – 130, 2008.
- CASTRO, N. R. ; COELHO,R.S.B. ; LARANJEIRA, D. ; PIMENTEL, R. M. M.; FERREIRA, C. P. Murcha de fusário em *Helicônia*: Fontes de resistência, método alternativo de detecção e defesa estrutural. **Summa Phytopathologica**, v.36, n.1, p.30 – 34, 2010.
- CAVICCHIOLI,M. **Análise de oleos essenciais de frutas cítricas por cromatografia gasosa de alta resolução (colunas capilares)**. São Carlos, 1986, 38p. Monografia (Curso de Graduação) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- CHARR,J.S. **Estudos analíticos e modificação química por acetilação do linalol contido no óleo essencial da espécie *Aniba duckei* Kostermans** São Carlos, 2000, 150p. Tese de (Doutorado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- CHISTIAN, E.J.; GOGGI, A.S. Aromatic plant oils as fungicide for organic corn production. **Croup Science**, v.48, n.5, p. 1941 – 1951, 2007.
- CORRÊA, M.P. **Dicionário de Plantas úteis do Brasil**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1978. p.474.
- COSTA, P.R.R. Safrol e eugenol: Estudo da reatividade química e uso em síntese de produtos naturais biologicamente ativos e seus derivados. Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais. **Química nova**, v.33, n.3, p.357 – 369, 2000.
- CRACKER, L.E.; SIMON, J.E. **Herbs, Species and Medicinal Plants**. Phoenix: Onyx, 1987. v.1. 329p.
- CRAVEIRO, A.A. et al. **Óleos Essenciais de Plantas do Nordeste**. Fortaleza: EUFC, 1981. 210p.
- DI STASI, L.C. **Plantas medicinais arte e ciência**. Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo. UNESP, 1996. 231p.

- DUARTE, M.L.R. **Doenças de Plantas no Trópico Úmido Brasileiro II.** Fruteiras Nativas e Exóticas. Embrapa. 2003, p.191 – 208.
- FAJARDO, G.; MARTINEZ, E.M.; VILAREM, G.; GASET, A.; SANTOS, J.M.. Comparative study of the oil and supercritical CO₂ extract of Mexican pimento (*Pimenta dioica* Merrill). **J. Essent. Oil Res.**, v.9. n.2, p. 181-185, 1997
- FRAVEL, D.; OLIVAIN, C.; ALABOUVETTE, C. Fusarium oxysporum and biocontrol. **New Phytologist**, n. 157, p. 493 – 502, 2003.
- FREIRE, M.M. **Composição e atividade antifúngica do óleo essencial de hortelã-pimenta (*Mentha piperita* L.).** Viçosa, 2006, 67p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
- FERREIRA, R.B. **Utilização de resíduos orgânicos no controle de Fusarium oxysporum f. sp. passiflorae em maracujazeiro amarelo.** São Luis. 2009. 82p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual do Maranhão.
- FIGUEIREDO, L.P. ; VALENTE, W.A. ; DIAS, M.V. ; BORGES, S.V. ; PEREIRA, P.A.P. ; PEREIRA, A.G.T. ; CLEMENTE, P.R. Efeito da adição de suco de maracujá e tempo de cozimento sobre a qualidade de doces do albedo de maracujá em calda. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.29, n.4, p. 825 – 827, 2009.
- FONT QUER, P. **Plantas medicinales.** El Discorides Renovados. Barcelona: Labor, 1967. 1033p.
- GARCIA, R.; ALVES, E.S.S.; SANTOS, M.P.; VENTURA, J.A.; FERNANDES, P.M.B. Atividade antimicrobiana e uso potencial de monoterpenos como preservantes de frutas tropicais. **Jornal Brasileiro de Microbiologia**, v.39, n.1, p. 163 – 168, 2008.
- GLEASON, M.L.; EDMUNDS, B.A. **Tomato diseases and disorder.** Department of Plant Pathology. v.12, p.28 – 30, 2006.
- GUENTHER, E. **The Essential Oils.** Individual essential oils of the plant families Gramineae, Lauraceae, Burseraceae, Myrtaceae, Umbelliferae and Geraniaceae. New York: D. Van Nostrand. V.4, p.370-377, 1950.

- HADIZADEH, I.; PEIVASTEGAN, B.; HAMZEHZARGHI, H. Antifungal activity of essential oils some medicinal plants of Iran against *Alternaria Alternate*. **American Journal of applied Sciences**, n. 5, p. 857 – 861, 2009.
- HUANG, Y.; ZHAO, J.; ZHOU, L.; WANG, L.; GONG, Y.; CHEN, X.; GUO, Z.; WANG, Q.; JIANG, W. Antifungal activity of the essential oil of *Illicium verum* fruit and its main component trans – anethole **Journal Molecules**, v.15, p. 58 – 69, 2010.
- KATZER, G. Allspice (*Pimenta dioica* [L.] Mer.). Disponível em: <<http://www-ang.kfunigraz.ac.at/~katzer/eugl/pime-dio.html>> Acesso em: 27 mar. 2010.
- KIMATI, H.; AMORIM, L.; RESENDE, J.A.M.; BENJAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. **Manual de Fitopatologia II. Doenças de Plantas Cultivadas**. p. 470 – 473, 2005.
- KIMATI, H. ; BERGAMIN F. A. ; CAMARGO, L. E. A. ; RESENDE, J. A. M. **Manual de Fitopatologia II. Doenças de Plantas Cultivadas**. 3 ed. São Paulo. Agronômica Ceres. 1997. 774p.
- KIRK, A.; OTHMER, B. **Encyclopedia of Chemical Technology**. 3.ed., v.16, , p.307-332, 1981
- KOLLMANNSBERGER,; NITZ, S. The flavor-composition of supercritical gas extracts: 2. Allpice (*Pimenta dioica*). **Chemie Mikrobiologie Technologie der Lebensmittel**, p.116-126, 1993.
- .LANÇAS, F.M. **Cromatografia Gasosa**. São Carlos: Suprema, 1993, 254p.
- LANDRUS, L.R.; KAWASAKI, M.L. **The genera of Myrtaceae in Brasil na illustrated synoptic treatment and identification** Keys. Briattonia, v.49, n.4, p.508-36, 1997.
- LE MOS, T.L.G. Antimicrobial activity of essential oils of Brazilian plants **Phytotherapy Research**, v.4, p.82-84, 1990.
- LOPÉZ, B.A.; CAPÓ, A.T.; GONZÁLEZ, Y.C. Actividad analgésica y antipirética de um extrato fluído de *Pimenta dioica* L. y evaluación de su toxicidad aguda oral. **Revisa cubana de Farmácia**. N.3, p. 198-203, 1998.
- MARINHO, S.C. **Estudo químico, avaliação eletroquímica e atividade larvicida do óleo essencial das folhas da Pimenta dioica L. frente Aedes aegypti** (LINNAEUS, 1762). João Pessoa. 2010, 125p. Dissertação (Doutorado). Universidade Federal da Paraíba.

- MATOS, F.A. **As plantas da Farmácia Viva**. Fortaleza: Ed. Universidade Federal do Ceará, v.1, 57p. 1997.
- MENEZES, M.; OLIVEIRA, S.M.A. **Fungos Fitopagênicos**. Recife: UFRPE, Imprensa Universitária. 1993, 277p.
- MILLER, S.A.; ROWE, R.C.; RIEDEL, R.M. Fusarium and verticillium wilts of tomato, potato, pepper and eggplant. **Plant Pathology**, v.57, p. 221 – 233, 2008.
- MOLEYAR, V. and NARASIMHAM, F. Antifungal activity of some essential oil components. **Food Microbiology**, v.3, p. 331 – 336, 1986.
- MONTEIRO, A. S. **Análise genômica e sequenciamento automático de rDNA em populações de *Fusarium oxysporum*** Maceió, 2004, 126p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Alagoas
- MONTEIRO, Odair. dos Santos. **Estudos analíticos do eugenol contido no óleo essencial extraído dos frutos da espécie *Pimenta dioica* e sua aplicação como agente bactericida**. São Luis, 2004. 98p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Maranhão.
- MOTA, W.F.; FINGER, F.L.; CECON, P.R.; SILVA, D.J.H.; CORREA, P.C.; FIRME, L.P. Conservação pós – colheita de quatro cultivares de quiabo influenciada por filme PVC e temperatura. **Horticultura Brasileira**, v.28, n.1, p. 12 – 18, 2002.
- MOUCHREK FILHO, V. E. **Estudos Analíticos e modificações químicas por metilação e acetilação do eugenol contido no óleo essencial extraído das folhas da espécie pimenta dioica Lindl**. São Carlos. 2000, 124p. Tese (Doutorado) – Instituto de Química de São Carlos. USP
- MUNIZ et al. **Rendimento e composição química do óleo essencial de folhas frescas e secas do Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L) coletados em dois diferentes horários**, 29^a Reunião da Sociedade Brasileira de Química, 2006.
- MUSLIM, A.; HORINOUCI, A.; HIDAKUMACHI, M. Biological control of Fusarium wilt hypovirulent binucleate rhizoctonia in greenhouse conditions, **Mycoscience**, n.44, p.74 – 84, 2003.
- NANICA, I. **Abacaxi: Do plantio ao mercado**. Porto Alegre: Cimo Continentes. p. 14 – 16. 2000

OKWO, D.E.; ANURUM,A.N.; OKORONKWO, J.I. Phytochemical composition and in vitro antifungal activity screening of extracts from citrus plants against *Fusarium oxysporum* of okra plant(*Hibiscus esculentum*). **African Crop Science Conference Proceedings**, n.8, p.1755 – 1758, 2007.

OMS apóia estudo com plantas medicinais. Disponível em: <http://www.drashi/fitoterapia_oms_apoia_estudos_com_plantas_medicinais.ht> Acesso em: 28 ago. 2010.

PARRY, J.W. **Spices**. New York: Chemical, 1969. v.I. p.163 - 165.

PARRY, J.W. **Spices**. New York: Chemical,1969. v.II. p.7-11.

PINO, J.; ROSADO, A.; GONZALEZ, A. Analysis of the essential oil of pimento berry (*Pimenta dioica*). **Nahrung.**, v.33, n.8, p. 717-720, 1989.

PIERRO,A.C. **Tomates**. Qualidade que se planta. v.1, p. 10 – 14, 2000

PIRES, M.C. **Propagação do maracujazeiro por estaquia e enxertia em estacas enraizadas**. Brasília, 2007. 86p. Dissertação (Mestrado) Universidade de Brasília.

PITTA, G.P.B. **Flores e plantas ornamentais para exportação: aspectos fitossanitários**. Brasília-DF, EMBRAPA – SP, 1995, 50p.

PLANT IMAGES. *Pimenta dioica*. Disponível em: <<http://www.rain-tree.com>> Acesso em: 11 mar. 2010.

PLANTS of the Myrtaceae Family. Disponível em: <http://www.desert-tropicals.com/Plants/Myrtaceae/Pimenta_dioica.html> Acesso em: 11 mar. 2010.

PURVES, W.K. **Vida a Ciência da Biologia**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005, p.530 – 531.

PUTZKE, J. **Os reinos dos Fungos**. Ed. Santa Cruz do Sul: Edunis, 1998. 605p.

RALPH, L.S. et al. **Identificação sistemática de compostos orgânicos**. Manual de Laboratório. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, p. 367-378, 1983.

RIBEIRO, J.D. **Estudo analítico e avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial da *Pimenta dioica* Lindl.** João Pessoa, 2009, 93p. Dissertação de (Mestrado). Universidade Federal da Paraíba

- ROBLES, C. et al. Essential Oil Composition of *Cistus Albidus* Leaves. **Phytochemistry**, v.48, n.8, p. 1343-1345, 1998.
- RODRIGUEZ, M. et al. Antimicrobial activity of *Pimenta dioica*. **Alimentaria**, v.33, n.8, p. 107-110, 1996.
- ROSSET, M.; ZAMARION, V.M.; FACCIONE, M.; FARIA, T.J.; PINTO, J.P.; BARBOSA, A.M.; SOUZA, J.R.P. Estudo químico da fração diclorometânica do extrato de *Ocimum gratissimum* L. **Semina, Ciências Agrárias**, v.26, n.4, p. 515 – 520, 2005
- SAFDAR ALI, M.A.; KHAN, A.; HABIB, S.; RASHEED, A. and IFTIKHAR, Y. 2005. Management of yellow vein disease of okra through. **International Journal of Agricultur & Biology**. v.1, p. 145 – 147, 2005.
- SANTOS, B. F. F. **Obtenção e seleção de tomate visando à resistência ao tomato yellow vein streak vírus (TOYUSU)**. Campinas, 2009. 75p. Dissertação (mestrado). Instituto Agronômico de Campinas.
- SANTOS, M.V.S. **Diversidade de ácaros (ARACHNIDA: ACARI) Associados às flores tropicais na região Litoral Sul da Bahia e avaliação de produtos naturais para controle *Tetranychus abacae* Ilheus**, 2008. 96p. Disertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz.
- SCHREIER, P. **Analysis of volatiles methods and applications**. Berlin: Walter de Gruyter, 1984. 469p
- SERRA, I.K.R.S.; COELHO, R.S.B. Murcha de perlatotiopsis em Helicônia. Caracterização da doença e potenciais fontes de resistência. **Fitopatologia Brasileira**, v.32, n.1, p. 44 – 49, 2007.
- SILVA, G.S.; PEREIRA, A.L. Efeito da incorporação de folhas de nina ao solo sobre o complexo *Fusarium* x *Melodogyne* em quiabeiro. **Summa Phytopathologica**, v.34, n.4, p. 368 – 370, 2008.
- SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: UFRGS, 1999. 821p.
- SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MORRILL, T.C. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 5.ed. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan S.A., 1994. 387p.
- SOLOGUREN, F.J.; JULIATTI, F.C. Doenças fúngicas em plantas ornamentais em Uberlândia. **Biosc. J. Uberlândia**, v.23, n.2, p.42 – 52, 2007.

SOUZA JUNIOR, I.T.; SALES, N.L.P.; MARTINS, E.R. Efeito fungitóxico de óleos essenciais sobre o *Colletotrichum gloeosporioides* do maracujazeiro amarelo. **Revista Biotermas**. v. 22 p. 77 – 83, 2009.

The epicentre. Allspice. Disponível em: <<http://www.theepicentre.com/spices/allspices.htm>> Acesso em: 28 ago. 2010.

VALDEZ JÚNIOR, D. **Estudo analítico e antibacteriano do óleo essencial extraído das folhas da espécie *Pimenta dioica* Lindl.** São Luis, 2009. 105p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Maranhão.

YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Plantas **medicinais sob a ótica da química medicinal**. Moderna. Chapecó: Agrios, p. 17-44, 2001.

YUNES, A.R.; CECHIEL FILHO. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. 1ed. Itajaí: Editora da Universidade de Vale do Itajaí, 2007. 303p

WEYERSTAHL, P. et al. Volatile Constituents of Eugenia Uniflora Leaf Oil. **Planta medica**, p. 546 - 549, 1998.

WILLIAMS, DAVID G. **The chemistry of essential oils**. England: Micelle, 1996. 334p.

WOGIATZI, E.; GOUGOULIAS, N.; PAPACHATRS, A.; VAGELAS, I.; CHOULIARAS, N. Greek orégano essential oils production phytotoxicity and antifungal activity. **Biotechnology & Biotechnoloy Equipment**, v.23, n.1, p. 1150 – 1152, 2009.

ZACARONI, M. L.; CARDOISO, M.G.; SOUZA, P.E.; PIMENTEL, F.A. GUIMARÃES, L.G.L.; SALGADO, A.P.S. Potencial fungitóxico do óleo essencial de *Piper hispidinervum* (pimenta longa) sobre fungos fitopagênicos *Bipolaris sorokiniana*, *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum gloriosporioides*. **Acta Amazônia**, v.40, n.1, p.171 – 178, 20

APÊNDICE

Apêndice 1. Certificação da espécie *Pimenta dioica* L emitido pelo IBD

IBD INSTITUTO BIODINÂMICO

Rua Prudente de Moraes, 530 - Cep 18602-060 - Botucatu - SP
Fone / Fax: + 55 (0) 14 3882 5066
ibd@ibd.com.br - www.ibd.com.br



Marca para produtos de
Agricultura Orgânica

YEAR CERTIFICATE INTERNATIONAL MARKET

CONFIRMAÇÃO DE CERTIFICAÇÃO PARA ORGÂNICO
CERTIFICATION CONFIRMATION FOR ORGANIC

Production certified to IBD standards in compliance with EC 2092/91 Regulation and IFOAM Standards.

IBD standards also cover Social and Environmental Criteria such as: Child Labor, Medical Care, Personnel Development Programs and the Preservation / Recuperation of native areas.

CERTIFICATE NUMBER:	CA0212/05
VALIDITY:	AUGUST 24, 2005 TO AUGUST 24, 2006.
CERTIFIED SINCE:	JANUARY / 2000
CESSIONÁRIO - CESSIONARY	COOPERATIVA AGRÍCOLA MISTA DO PROJETO ONÇA LTDA. TAPEROÁ / BA BRAZIL
CÓD. PROJETO:	BA 034
PRODUTO - PRODUCT	GUARANÁ / GUARANÁ, SERINGUEIRA / RUBBER TREE, PIAÇAVA / PIASABA, DENDÊ / AFRICAN PALM, URUCUM / URUCUM, CRAVO / CLOVES, PIMENTA JAMAICA / ALLSPICE PEPPER, PIMENTA REINO / BLACK PEPPER, CACAU / COCOA, CASTANHA CAJU / CASHEW NUT, COCO / COCONUT, JENIAPAP / GENIAPAP.

Todos os produtos são produzidos sem o uso de organismos geneticamente modificados e/ou quaisquer produtos derivados de tais organismos. O produto não é oriundo de Agricultura Biodinâmica e não pode ser comercializado como produto Biodinâmico ou Demeter.

All products are produced without the use of genetically modified organisms and / or any products derived from such organism. This product is not of Biodynamic Agriculture and may not be traded as such nor as Demeter

Para vendas no mercado interno ou de exportação este certificado somente terá validade acompanhado do Certificado de Transação T/C.

For sales in the national market or for export products the certificate will only be valid when the Transaction Certificate T/C is issued.

BOTUCATU AUGUST 24, 2005


MARCO ANTÔNIO BALDONI
**IBD INSTITUTO
BIODINÂMICO**
Rua Prudente de Moraes, 530 CEP 18602-060
Fone/Fax+55(0) 14 3882 5066 - Botucatu/SP
ibd@ibd.com.br www.ibd.com.br

1/4

