



UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS


**ESTUDO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS  
E DA ATIVIDADE FUNGITÓXICA DO ÓLEO  
ESSENCIAL DAS FOLHAS DE EUCALYPTUS**

**ANA PAULA SOARES P. SALGADO**

**2001**

ANA PAULA SOARES P. SALGADO

**ESTUDO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS E DA ATIVIDADE  
FUNGITÓXICA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE  
*EUCALYPTUS***



Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Agroquímica e Agrobioquímica, para obtenção do título de "Mestre".

Orientadora

Dra. Maria das Graças Cardoso

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL

2001

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da UFLA**

Salgado, Ana Paula Soares Pinto

Estudo dos constituintes químicos e da atividade fungitóxicas do óleo essencial das folhas de *Eucalyptus* / Ana Paula Soares Pinto Salgado. -- Lavras : UFLA, 2001.

52 p. : il.

Orientador: Maria das Graças Cardoso.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

**Bibliografia**

1. Óleo essencial. 2. Eucalipto. 3. Fungo. I. Universidade Federal de Lavras. II.

**Título**

CDD-665.33  
-632.96

**ANA PAULA SOARES P. SALGADO**

**ESTUDO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS E DA ATIVIDADE  
FUNGITÓXICA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE  
*EUCALYPTUS***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Agroquímica e Agrobioquímica, para obtenção do título de "Mestre".

**APROVADA em terça-feira, 28 de fevereiro de 2001**

**Dra. Josefina Aparecida de Souza** UFLA

**Dra. Celeste Maria Patto de Abreu** UFLA

**Dr. Marcus Luis de Oliveira Penido** UFJF

*Maria das Graças Cardoso*  
**Dra. Maria das Graças Cardoso**

**UFLA**

**(Orientador)**

**LAVRAS**

**MINAS GERAIS - BRASIL**

A Deus,

Pela sua infinita bondade!

Aos meus pais,

Henrique e Ana Maria;

À minha querida avó,

Alexa;

**OFEREÇO**

Ao meu marido Sávio;

E meu filho João Paulo;

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

A Deus por um caminho tão iluminado!

À profa. Maria das Graças Cardoso pela nossa grande amizade, por ter sempre me acolhido de braços abertos, pronta para o que der e vier, a qualquer hora do dia ou da noite, pela sua orientação e dedicação, que me fizeram crescer e chegar até aqui.

Ao prof. Paulo Estevão de Souza (DPF-UFLA) pela sua co-orientação, o qual sempre que precisei, estava pronto a me servir.

Ao prof. Manoel Louzada Gavilanes (DBI-UFLA) pela co-orientação, amizade e sugestões.

À profa. Celeste Maria Patto de Abreu, que me estendeu as mãos na hora do desespero, por sua amizade e orientação nas análises estatísticas.

Aos professores e funcionários do Departamento de Química(DQI) pela grande convivência e amizade.

Aos amigos do Departamento de Fitopatologia(DFP), Elô, Marcos e Ana, pela amizade e ajuda.

Ao meu marido Sávio e ao meu filho João Paulo pelo amor, amizade e, acima de tudo, paciência durante a realização deste trabalho.

Aos colegas de curso, Carolina, Carla e Geraldo, pela convivência.

Aos grandes amigos do laboratório de Química Orgânica, Luciano, Priscila, Fábio, Vanisse, Anailda, Renata, Flávio, Grécia e João Marcos.

Às amigas Andrea, Ellem e Rosane, por tudo!

A Josy pela amizade e grande ajuda durante a realização deste trabalho.

A Ana Claudia e Norma pela ajuda nas análises estatísticas

À Coordenação e Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelas bolsas concedidas.

A todos que contribuíram de maneira direta ou indireta para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

A

RESUMO .....	i
ABSTRACT .....	ii
1 Introdução .....	1
2 Referencial teórico .....	4
3 Material e métodos .....	25
4 Resultados e discussão.....	31
5 Conclusões .....	34
6 Referencias Bibliográficas	49

## RESUMO

SOARES P. SALGADO, Ana Paula. Estudo dos constituintes químicos e da atividade fungitóxica do óleo essencial das folhas de *Eucalyptus*. LAVRAS: UFLA, 2001. 52 p. (Dissertação – Agroquímica e Agrobiológica)\*

Os óleos essenciais constituem um tipo de metabólito secundário de plantas que tem grande importância econômica, já que inúmeras são suas aplicações nos diversos ramos da sociedade, destacando-se principalmente nos setores alimentícios, farmacêuticos e perfumarias. Os óleos essenciais de eucalipto são compostos formados por uma complexa mistura de componentes orgânicos voláteis, frequentemente envolvendo 50 a 100 ou até mais componentes isolados, apresentando grupos químicos como: hidrocarbonetos, alcoóis, aldeídos, cetonas, ácidos e ésteres. Atualmente a ação fungicida desses óleos vem sendo bastante estudada. Assim sendo, o objetivo do presente trabalho foi caracterizar substâncias majoritárias no óleo essencial de três espécies de eucaliptos, *Eucalyptus citriodora*, *Eucalyptus camaldulensis* e *Eucalyptus urophylla*, e avaliar a ação fungitóxica das mesmas sobre fungos fitopatogênicos. Os óleos essenciais foram extraídos das folhas dos eucaliptos através de arraste a vapor de água, utilizando o aparelho de Clevenger modificado. As análises de composição química por CG/MS mostram que todas as espécies apresentaram um composto em comum identificado como citronelal, com tempo de retenção 17,35 min., sendo que foi mais abundante nas espécies *camaldulensis* e *citriodora*. Já para a espécie *urophylla*, o composto majoritário foi identificado como globulol, com tempo de retenção de 18,39 min. Os testes biológicos foram avaliados sob os fitopatógenos *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* e *Bipolaris sorokiniana*. As culturas utilizadas para os testes foram obtidas através de repicagens de uma cultura padrão. O método utilizado foi o bioanalítico "in vitro", observando o crescimento ou inibição dos microorganismos na presença de diferentes concentrações de óleo (5, 50 e 500 ppm), usando os meios de cultura BDA (Batata-Dextrose-Ágar) e PCA (Batata-Cenoura-Ágar). O efeito fungicida foi observado para o óleo essencial do *Eucalyptus urophylla*. Foi observada uma inibição do crescimento fúngico a partir da concentração de 500 ppm, na qual o diâmetro micelial foi de 1 cm x 4 cm da testemunha, após período de 6 dias, sob o fungo *Botrytis cinerea*. O óleo essencial do *E. urophylla* foi o único a apresentar ação fungitóxica. Com isto, podemos inferir que esta ação está correlacionada a presença do composto identificado como globulol, ausente nos demais óleos e sendo o composto mais abundante no *E. urophylla*.

---

\* Comitê Orientador: Maria das Graças Cardoso (Orientador), Paulo Estevão de Souza - UFLA, Manoel Louzada Gavilanes - UFLA, José Eduardo Brasil P. Pinto - UFLA.



## ABSTRACT

SOARES P. SALGADO, Ana Paula. Study of the chemical constituents and fungitox activity of the essential oil of *Eucalyptus* leaves. LAVRAS: UFLA, 2001. 52 p. (Dissertation – Agroquimical and Agrobiocquimical)\*

Essential oils make up a sort of secondary metabolite of plants which have a great economical importance since they have several applications in the many branches of the society, standing mainly, the food, pharmaceutical and perfumary setors. *Eucalyptus* essential oils are compounds constituted by complex mixture of volatile organic components, often involving 50 to 100 or even more isolated components, which present in their constitution hydrocarbonets, alcohols, aldehyde, ketones acids and esters at present, the fungicide action of such oils has been quite well studied.. The objetive of the present work was the characterize the majoritary substances in the essential oil of three different species of eucalyptus and evaluate their fungitoxo action on phytopathogenic fungi. Essential oils were extracted from the eucalyptus leaves through water steam dragging by utilizing Clevenger's modified apparatus. The analysis of chemical composition by CG/MS show that all the species presented a compound in common identified as citronellal with retention time of 17,35 min, its abundance being greater in the species camaldulensis and citriodora. But for the species urophylla, the most abundant compound was identified as globulol with retention time of 18,39 min. The biological tests were evaluated under the phytopathogens *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* and *Bipolaris sorokiniana*. The cultures utilized for the tests were obtained through transferring pieces of micellium from a standard culture. The method utilized was the "in vitro" bioanalytic, observing either growth or inhibition of the microorganisms in the presence of different concentratiois of oil (5, 50 and 500 ppm) using the culture media PDA (potato-dextrose-agar) and PCA (potato-carrot-agar). The most marked fungicidal effect was observed for the essential oil of *Eucalyptus urophylla*. an inhibition of the fungal growth from the concentration of 500 ppm was observed im which the mycelial diameter was of the 1 cm x 4 cm of the check after a period of 6 days under the fungus *Botrytis cinerea*. The essential oil of *E. urophylla* was the one to present fungitoxo action. So we may infer that this action is correlated with the presence of the compound identified as globulol, absent in the other oils and being the most abundant compound in *E. urophylla*.

---

\* Guidance Committee: Maria das Graças Cardoso (Major Professor), Paulo Estevão de Souza - UFLA, Manoel Louzada Gavilanes - UFLA, José Eduardo Brasil P. Pinto.

# 1 INTRODUÇÃO

O homem utiliza as plantas medicinais, aromáticas e condimentares desde a mais remota antiguidade, segundo relatam os testemunhos históricos pertencentes às diferentes civilizações e culturas. No início ele foi guiado pelo instinto, à semelhança dos animais, depois empiricamente, associando o poder curativo das plantas às práticas mágicas, místicas e ritualísticas; aprendendo mais tarde suas propriedades terapêuticas de acordo com os avanços tecnológicos (Corrêa Júnior et al, 1991).

A maioria dos trabalhos realizados com eucalipto no Brasil mostra que a princípio os estudos eram desenvolvidos com relação à adaptação, crescimento e produção de madeira destinada basicamente às indústrias de carvão vegetal, acarretando um desperdício do óleo presente em suas folhas, um produto natural de grande uso na área farmacêutica.

Com o decorrer do tempo, as pesquisas começaram a abordar também a produção de florestas para obtenção de outros produtos, como, por exemplo, madeira para serrarias, indústrias moveleiras, madeira para geração de energia e também a exploração das folhas para extração de óleo essencial.

Os óleos essenciais constituem um tipo de metabólito secundário de plantas que tem grande importância econômica, já que inúmeras são suas aplicações nos diversos ramos da sociedade, destacando-se o setor alimentício, farmacêutico e perfumaria. Por esta razão, vem crescendo, de forma lenta, o número de estudos sobre a constituição e propriedades biológicas dessas essências, bem como os fatores taxonômicos, ambientais e de cultivo que levam à variação tanto na quantidade como na qualidade desses óleos.

↘ A ISO ( International Standart Organization) define óleos essenciais como os produtos obtidos de partes de plantas através de destilação por arraste com vapor d'água , bem como os produtos obtidos por prensão dos pericarpos de frutos cítricos. De forma geral, são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas. Também podem ser chamados de óleos voláteis, óleos etéreos ou essências. Uma característica físico-química importante é a de serem solúveis em solventes orgânicos apolares, e de apresentarem solubilidade limitada em água, o suficiente para aromatizar as soluções aquosas, denominadas hidrolatos. Os seus constituintes químicos variam grandemente em estrutura. Normalmente, na mistura, os compostos encontram-se em diferentes concentrações, porém um deles é a substância majoritária, sendo que a importância e utilização dessa essência será determinada pelo composto principal (Simões et al, 1999).

O eucalipto é uma mirtácea arbórea e seu cultivo se dá melhor em regiões temperadas, entretanto, no que se refere à adaptação ao solo, o eucalipto encontra facilmente condições favoráveis para o seu desenvolvimento, atingindo o máximo de seu crescimento durante a sua primeira idade (um ano). O plantio é feito em sementeira, e quando a planta atinge uma certa altura, é transplantada para os plantários. Ao chegarem a uma altura entre vinte e vinte e cinco centímetros, vão para o local definitivo, o que torna necessário o tratamento das jovens árvores para se obterem árvores vigorosas, sãs e de interesse econômico.

A investigação dos óleos essenciais levou ao descobrimento de hidrocarbonetos isoméricos denominados terpenos; porém, os óleos essenciais são misturas muito complexas e muito variáveis em seus constituintes, sendo encontrados somente os terpenos mais voláteis, aqueles de baixo peso molecular, como os monoterpenos com 10 carbonos e sesquiterpenos com 15 carbonos. Em geral, os óleos essenciais são constituídos de terpenos mais complexos, como o

citronelal e o cineol; outros constituintes da essência incluídos na porcentagem de 20 a 30 % são:  $\alpha$  - pineno, piperitona, felandreno, butiraldeído, hexanal.

No que diz respeito aos estudos biológicos, a pesquisa de novos compostos biologicamente ativos tem sido uma das maiores tarefas dos fitoquímicos em todo o mundo. O processo que vai da escolha da planta até a obtenção de uma substância biologicamente ativa é longo e multidisciplinar. Sabe-se que a partir da última década, a conscientização química sobre o uso indiscriminado e incorreto de defensivos agrícolas no ambiente rural e urbano, causando prejuízos aos ecossistemas e ao homem, tem motivado o desenvolvimento de métodos e produtos alternativos no controle de doenças de plantas.

↳ É de fundamental importância a pesquisa constante e a procura de novos grupos químicos com efeitos fungicidas. Na natureza, a grande maioria das plantas são resistentes aos diferentes patógenos, e esta resistência pode estar relacionada à existência de fungicidas naturalmente produzidos. Portanto, espera-se que a descoberta de substâncias naturais com efeito fungicida possa contribuir para o controle das doenças das plantas. Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito fungitóxico do óleo essencial de 3 espécies de eucalipto sobre os gêneros de fungos *Fusarium oxysporum*., *Botrytis cinerea* e *Bipolaris sorokiniana*.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Considerações Gerais**

Nos eucaliptos, os óleos etéreos encontram-se basicamente em suas folhas. São produzidos e armazenados por glândulas e estão distribuídas de forma abundante no parênquima da folha da maioria das espécies de eucaliptos. Existem diversas teorias sobre a função dos óleos essenciais dos eucaliptos, mas poucos fatos caracterizam seu papel ecológico e fisiológico. Eles já foram considerados como repelente de insetos que se alimentam de suas folhas, inibidores da germinação e de crescimento de outras plantas, controladores da atividade microbiológica de alguns fungos e bactérias, entre outros (Boland, Brophy and House, 1991).

### **2.2 Classificação dos óleos essenciais de eucalipto**

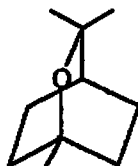
Entre as aproximadamente 600 espécies de eucaliptos descritas, pouco mais de 200 têm sido examinadas com relação à produção e ao teor de óleo essencial, e menos de 20 são exploradas comercialmente (Penfold and Willis, 1961; Lassak, 1988 e Boland, Brophy and House, 1991). Segundo esses, os óleos essenciais de eucaliptos estão divididos basicamente em três grupos principais, em função do seu uso final: óleos destinados a produtos medicinais, óleos industriais e óleos de perfumaria. As principais espécies de eucalipto produtoras de óleo estão relacionadas na TABELA 1.

TABELA – 1 Principais espécies de eucalipto utilizadas para produção de óleo essencial (Lassak, 1988 e Boland, Brophy and House, 1991)

Espécies		Componente Principal	
Óleos medicinais	Nome	Teor	
<i>E. camaldulensis</i>	Cineol	80-90%	
<i>E. globulus</i>	Cineol	60-85%	
<i>E. smithii</i>	Cineol	70-80%	
<i>E. tereticornis</i>	Cineol	45%	
<i>E. viridis</i>	Cineol	70-80%	
Óleos industriais			
<i>E. dives</i> (var. felandreno)	Felandreno	60-80%	
<i>E. dives</i> (var. piperitona)	Piperitona	40-56%	
<i>E. elata</i> (var. piperitona)	Piperitona	40-56%	
<i>E. radiata</i> (var. felandreno)	Felandreno	35-40%	
Óleos para perfumaria			
<i>E. citriodora</i> (var. citronelal)	Citronelal	65-80%	
<i>E. staigerana</i>	Citral	16-40%	

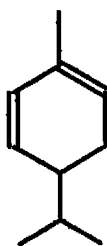
Os óleos medicinais são aqueles que têm ação terapêutica e tem como principal agente o 1,8-cineol (FIG.1). Segundo as especificações da Farmacopéia Britânica (Boland, Brophy and House, 1991), a qualidade do óleo medicinal é dada pelo seu teor do agente ativo. Este requer que o óleo medicinal contenha não menos que 70% de cineol e que seja praticamente livre de  $\alpha$  e  $\beta$ -felandreno (FIGS 2 e 3) e é destinado à fabricação de produtos farmacêuticos (inalantes, estimulante de secreção nasal, pasta dental, antissépticos), ou simplesmente com função de dar sabor e aroma aos medicamentos. Muitas espécies contêm 1,8-

cineol (FIG. 1) em seus óleos, porém um número pequeno contém uma concentração alta desta substância, junto com um alto rendimento do óleo.



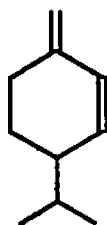
1,8-cineol

FIGURA 1: Estrutura do 1,8 cineol



$\alpha$ -felandreno

FIGURA 2: Estrutura do  $\alpha$ -felandreno



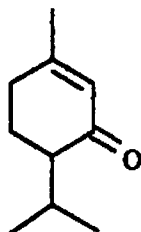
$\beta$ -felandreno

FIGURA 3: Estrutura do  $\beta$ -felandreno

As aplicações medicamentosas de óleos de eucaliptos são muitas e variadas. A ação farmacológica ocorre de uma irritação da mucosa nasal e dos

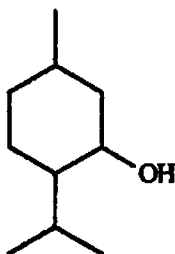
brônquios, a qual estimula a secreção das mucosas, provocando uma desobstrução dessas vias. Por esta razão, os óleos são usados como inalantes com vapor ou outras preparações para o alívio dos sintomas de gripes e resfriados. Como o óleo tem ação bactericida e um odor agradável, é usado como antisséptico.(Vitti, 1999).

Entretanto, os óleos para fins industriais contêm, principalmente, piperitona (FIG.4) e  $\alpha$ -felandreno (FIG.3) como seus principais constituintes. Os óleos ricos em felandreno são usados quase que exclusivamente para aromatizar os desinfetantes e na indústria de sabonetes líquidos, enquanto a piperitona é usada para a síntese de mentol (FIG..5), ambos usados como flavorizantes e como aditivos em várias preparações medicinais e para a síntese de timol (FIG.6), um fungicida (Ferreira e Santos, 1997).



Piperitona

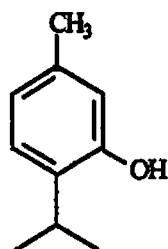
FIGURA 4: Estrutura da Piperitona



Mentol

FIGURA 5: Estrutura do Mentol

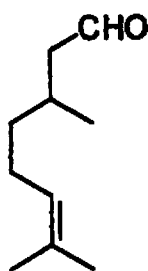




Timol

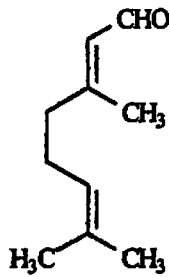
FIGURA 6: Estrutura do Timol

Na indústria de perfumes, poucas espécies de eucaliptos são usadas, fazendo parte da composição de perfumes para diversos fins, desde a fabricação de cosméticos em geral até a aromatização de produtos de limpeza, como sabões e detergentes. A espécie *Eucalyptus citriodora* é a principal espécie explorada no Brasil para a produção deste tipo de óleo, apresentando como componente principal o citronelal (FIG.7). Já o *Eucalyptus staigeriana* pertencente a este grupo, é cultivado em pequena escala no Brasil e seu principal componente é o citral (FIG..8) (Vitti, 1999).



Citronelal

FIGURA 7: Estrutura do Citronelal



Citral

FIGURA 8: Estrutura do Citral

### 2.3 Caracterização dos óleos essenciais de eucalipto

Penfold and Willis (1961) relatam que muitas plantas contêm óleo, podendo este estar presente nas cascas, flores, frutos, folhas, raízes ou madeiras. A maioria deles é removível por destilação a vapor, e são chamados de óleos voláteis ou óleos essenciais. Nos eucaliptos, eles ocorrem basicamente nas folhas.

Boland, Brophy and House (1991) definem esta classe de compostos como substâncias voláteis, isoladas da planta por meio de destilação a vapor ou por processos mecânicos; são insolúveis em água, separando-se espontaneamente da fase aquosa. Os óleos essenciais de eucalipto são compostos por uma complexa mistura de componentes orgânicos voláteis, frequentemente envolvendo de 50 a 100 ou até mais componentes isolados, apresentando grupos químicos como hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos, cetonas, ácidos e ésteres. Os óleos essenciais nos eucaliptos são produzidos e armazenados por glândulas. A sua função e o seu processo de biossíntese são ainda bastante discutíveis, e talvez eles não tenham ainda uma função definida e sejam simplesmente um produto do metabolismo da planta. As glândulas de óleo estão distribuídas de forma abundante no parênquima da folha da maioria das

espécies de eucalipto, apresentando-se como pequenos pontos translúcidos quando observados contra a luz.

Boland, Brophy and House (1991) afirmam que existem diversas teorias sobre a função dos óleos essenciais em eucaliptos, mas poucos fatos caracterizam seu papel ecológico e fisiológico. Eles já foram considerados produtos tóxicos do metabolismo na planta, sem uma utilidade para a mesma, como repelente a insetos que se alimentam de suas folhas, inibidores da germinação e de crescimento de outras plantas, controladores da atividade microbiológica de alguns fungos e bactérias, entre outros.

#### **2.4 Fontes de variação na produção e qualidade do óleo de eucalipto**

Existem diversos fatores que podem interferir na produção e qualidade dos óleos de eucalipto; estes podem ser divididos em diversos grupos, como variabilidade genética intra e interespecífica, fisiológica (tipo e idade da folha), ambiental e métodos utilizados para extração e análise do óleo. O tipo de manejo também foi citado como uma das fontes de variação na produção de óleo essencial (Boland *et al*, 1984).

##### **2.4.1 Variabilidade genética**

A variabilidade genética das espécies produtoras de óleo possibilita a identificação e seleção de materiais genéticos, procedências ou progênies, que apresentem um maior rendimento e qualidade de óleo essencial. Desse modo, ela é considerada uma importante fonte de variação na produção e qualidade de óleo essencial.

Muitos trabalhos relatam a existência de variabilidade do rendimento em óleo e dos componentes químicos, ocorrendo entre populações e entre árvores de

uma mesma população. Outros consideram a variação na composição e produção de óleo como um importante instrumento para a identificação de sub-espécies e variedades.

Doran and Brophy (1990), estudando procedências tropicais de espécies de *E. camaldulensis* Dehnh. e *E. tereticornis* Smith em seu ambiente natural, na Austrália, e em um teste de progênie em Zimbabwe, observaram que existe uma substancial variação inter e intra-específica no rendimento de óleo destas espécies no norte da Austrália. Houve também variação qualitativa em função dos altos níveis de  $\alpha$ -felandreno (FIG.3) em algumas populações e relativa ausência em outras. Outra observação citada foi a de que algumas árvores amostradas individualmente indicam produzir óleo de mais alta qualidade do que a média das árvores da população, existindo, portanto, um potencial de melhoramento genético para a qualidade de óleo nesta espécie.

#### **2.4.2 Tipo morfológico e idade fisiológica da folha**

Penfold and Willis (1961) apresentaram 5 tipos morfológicamente distintos de folha durante o tempo de vida da árvore, cada tipo correspondendo a um estágio do desenvolvimento ontogênico: -folhas cotiledonares; -folhas de plântulas (aproximadamente de 5 a 10 pares de folhas acima dos cotilédones); -folhas juvenis (com características morfológicas diferentes das folhas adultas podendo persistir por alguns anos); -folhas intermediárias (ocorre uma transição gradual entre os estágios 3 e 5); e -folhas adultas (maioria das folhas de uma árvore madura). Estas fases são completamente separadas e não devem ser confundidas com a idade fisiológica da folha, comumente denominada pelos termos "folhas jovens" (a idade aproximada de um mês ou menos, sendo que estão localizadas nas extremidades), "folhas maduras" (a idade aproximada de 6 meses ) e "folhas velhas" (com aproximadamente 12-18 meses de idade). A

média de vida normal das folhas de eucalipto é de 18 meses, podendo estar sujeito a uma ampla variação, existindo folhas que permanecem somente poucos meses, nos casos de espécies de crescimento rápido; em espécies de crescimento mais lento, persistem por 3 a 4 anos.

Boland, Brophy and House (1991) relatam que o rendimento de óleo de folhas de plântulas é invariavelmente muito menor que aqueles de outras fases para a espécie *E. delegatensis*; que a comparação entre as fases juvenil, intermediária e a adulta é inconstante e parece depender da espécie. Assim, verifica-se que pode existir uma variação na produção de óleo em função da idade da folha e da espécie estudada.

Mwangi, Guantai and Muriuk (1981) trabalharam com amostras de folhas de *E. citriodora* de diferentes locais no Kenia, entre setembro de 1980 e junho de 1981. Concluíram que a composição química do óleo essencial não está relacionada com a variação sazonal e não depende da idade da árvore.

### **2.4.3 Ambiente**

Segundo Boland, Brophy and House,(1991), apesar de serem feitas diversas observações sobre os fatores ambientais que influenciaram a produção do óleo, existem poucos estudos a este respeito. Os autores comentam, ainda, que a maioria dos trabalhos tem focado as influências sazonais e diurnas nos óleos essenciais. Tais estudos têm sido conduzidos para muitas espécies e apresentam resultados contraditórios.

### **2.5-Métodos de Extração**

A avaliação do conteúdo de óleos essenciais de forma rápida, em pequenas amostras de material vegetal, é feita por diversos métodos:

hidrodestilação, destilação por arraste de vapor, extração por solventes orgânicos comuns e extração por CO<sub>2</sub> líquido. Segundo Charles and Simon (1990), a extração por CO<sub>2</sub> líquido, apesar da alta eficiência, é caro e de uso limitado, os outros três métodos são mais comuns, apresentando uma grande rapidez e simplicidade de execução, sendo que, destes, o segundo é muito recomendado por apresentar melhor rendimento na extração de óleo de *Eucalyptus* sp, embora seja um método mais complexo do que o primeiro.

Os métodos de extração variam conforme a localização do óleo volátil na planta e com a proposta de utilização do mesmo. (Simões *et al*, 1999).

Alguns deles estão definidos abaixo:

#### –Enfloração (*Enfleurage*)

Esse método já foi muito utilizado, mas atualmente é empregado apenas por algumas indústrias de perfumes, como o caso de algumas plantas com baixo teor de óleo de alto valor comercial. É empregado para extrair óleo volátil de pétalas de flores (laranjeiras, rosas); as pétalas são depositadas, à temperatura ambiente, sobre uma camada de gordura, durante um certo período de tempo. Em seguida, estas pétalas esgotadas são substituídas por novas até a saturação total, quando a gordura é tratada com álcool. Para se obter o óleo volátil, o álcool é destilado a baixa temperatura e o produto assim obtido possui alto valor comercial.

#### –Arraste por vapor d'água

Os óleos voláteis possuem pressão de vapor mais elevada que a da água, sendo, por isso, arrastados pelo vapor d'água. Em pequena escala, emprega-se o aparelho de Clevenger. O óleo volátil obtido, após separar-se da água, deve ser seco com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro. Esse procedimento, embora clássico, pode levar à

formação de artefatos em função da alta temperatura empregada. Preferencialmente, esse método é utilizado para extrair óleo de plantas frescas.

#### **-Extração com solventes orgânicos**

Os óleos voláteis são extraídos, preferencialmente, com solventes apolares (éter, éter de petróleo ou diclorometano) que, entretanto, extraem outros compostos lipofílicos, além dos óleos voláteis. Por isso, os produtos assim obtidos raramente possuem valor comercial.

#### **-Prensagem**

Esse método é empregado para extração dos óleos voláteis de frutos cítricos. Os pericarpos desses frutos são prensados e a camada que contém o óleo volátil é, então, separada. Posteriormente, o óleo é separado da emulsão formada com a água através de decantação, centrifugação ou destilação fracionada.

#### **-Extração por CO<sub>2</sub> supercrítico**

Esse método permite recuperar os aromas naturais de vários tipos e não somente o óleo volátil, de modo bastante eficiente. Atualmente, é o método de escolha para extração industrial de óleos voláteis. Nenhum traço de solvente permanece no produto obtido, tornando-o mais puro do que aqueles obtidos por outros métodos. Para tal extração, o CO<sub>2</sub> é primeiramente liquefeito através de compressão e, em seguida, aquecido a uma temperatura superior a 31°C. Nessa temperatura, o CO<sub>2</sub> atinge um quarto estado, no qual sua viscosidade é análoga à de um gás, mas sua capacidade de dissolução é elevada como a de um líquido. Uma vez efetuada a extração, faz-se o CO<sub>2</sub> retornar ao estado gasoso, resultando na sua total eliminação.

Segundo Mancini (1984) e Martins (1996), o processo mais utilizado para realizar as extrações é o arraste com vapor d'água, que além de apresentar bom rendimento, apresenta a facilidade de execução e baixo custo em relação à extração com CO<sub>2</sub> supercrítico.

## **2.6 Análise quantitativa e qualitativa**

A análise por cromatografia em fase gasosa é uma técnica efetiva para separar misturas muito complexas, como os óleos essenciais, e obter bons resultados qualitativos e quantitativos (Bonato, 1990).

Os detectores dos cromatógrafos podem ter resposta diferente para cada composto presente no óleo essencial, tornando necessária a sua calibração com as substâncias desejadas (Johnson, 1968). No entanto, este autor destaca que a grande dificuldade na análise quantitativa é a obtenção de compostos com alto grau de pureza para servir como padrão e, assim, proceder a calibração externa do detector utilizado.

A identificação dos compostos pode ser feita com a co-injeção de amostras padrão no cromatógrafo a gás. No entanto, estruturas diferentes podem apresentar um mesmo tempo de retenção em condições similares de análise. Assim, a prova mais rigorosa é a determinação de propriedades espectrométricas (Rudloff, 1974). Muitos autores apresentam os resultados de identificação dos componentes do óleo essencial apenas com base na técnica de CG/EM (cromatografia em fase gasosa combinada com espectrometria de massas), e a identificação do composto é feita por comparação com a biblioteca de espectros do instrumento, o que ainda pode levar a enganos. Outros dados espectroscópicos, como a espectroscopia no IV e de ressonância magnética nuclear, que exigem a purificação dos compostos por técnicas cromatográficas,



podem ser usados principalmente na confirmação de estruturas dos compostos majoritários (Rudloff, 1974; Gros, Pomilio e Seldes, 1985).

## 2.7 Espécies vegetais estudadas

O gênero *Eucalyptus* compreende mais de 500 espécies, entre elas o *E. urophylla*, *E. camaldulensis* e *E. citriodora*, estudadas no presente trabalho.

### 2.7.1 *Eucalyptus urophylla*: origem e principais características

O *E urophylla* é uma espécie que tem sua origem fora do continente australiano. Nativo da ilha de Timor e outras ilhas vizinhas na Indonésia, onde ocorre em colinas e montanhas entre 500 e 1800 m de altitude; muitas vezes se encontra associado com *Eucalyptus alba*, acreditando-se que em algumas áreas existe hibridação entre ambas (Golfari, Caser e Moura, 1978). Sua ocorrência varia de 7 a 10° de latitude sul a altitudes compreendidas entre 800 e 1400 m. A região de origem se caracteriza por ocorrência de chuvas de verão, com intensidade entre 1000 a 1500 mm<sup>3</sup>, com uma estação seca não muito severa, dando origem a um período de seca que dura de quatro a cinco meses. A temperatura máxima do mês mais quente encontra-se em torno de 29 °C e a temperatura mínima média do mês mais frio varia entre 8 a 12 °C (Golfari, 1975).

Foi introduzida no Brasil em 1919, na cidade de Rio Claro (SP), na forma de arboreto, juntamente com outras espécies. Nos dias atuais, pode-se afirmar que o *Eucalyptus urophylla* é muito conhecido e utilizado no Brasil, sendo considerado uma das espécies de eucalipto mais importantes para as regiões tropicais, por seu marcante vigor. Apresenta um elevado potencial para as diversas regiões brasileiras, tendo sido testada de Norte a Sul. Juntamente

com o *Eucalyptus camaldulensis* é considerada uma das espécies de maior plasticidade.

### 2.7.2 *Eucalyptus camaldulensis*: origem e principais características

Foi descrita pela primeira vez, em 1932, pelo alemão Frederick Dehnhardt, que deu essa denominação em homenagem ao distrito de Camalduli, situado próximo à cidade de Nápoles, na Itália, onde as árvores desta espécie eram cultivadas (Hall, 1978).

O *E. camaldulensis* é originário da Austrália, pertence ao gênero *Eucalyptus*, a espécie de mais ampla distribuição geográfica neste continente, ocorrendo em praticamente todo o território australiano, onde são encontrados geralmente ao longo de córregos e rios, muitos deles temporários nas regiões árida e semi-áridas (Golfari, 1975). Suas características principais são: tolerância a inundações temporárias e resistência a temperaturas elevadas e períodos secos prolongados ao mesmo tempo (Golfari, Caser and Moura, 1978). Dessa forma, essa espécie é encontrada entre as latitudes de 11° a 39° S e as altitudes de 30 a 600 m, crescendo sob várias condições climáticas, desde regiões muito quentes, sub-úmidas a semi-áridas, com temperatura máxima de 40 °C, mínima de até 3 °C e precipitação anual de 150 a 1250 mm<sup>3</sup> (Boland et. al., 1984).

Foi uma das primeiras espécies a serem plantadas fora do continente australiano. Em 1867 ocorreram os primeiros plantios no Paquistão, Uruguai e Argentina; em 1870 na Itália, em 1884 na Turquia e Israel. Em alguns países africanos, somente ocorreu o plantio final do século XIX (FAO, 1981).

Estudos de Andrade (1939) mostram que, no Brasil, a espécie foi introduzida inicialmente no estado de São Paulo, no início do século passado, onde era denominada de *Eucalyptus rostrato*. Posteriormente, devido à sua ampla plasticidade, ela se disseminou para quase todo o país, sendo cultivada

desde a região Sul até o Nordeste e Amazônia. É considerada, desde a sua introdução, uma espécie de grande futuro, especialmente para as regiões de cerrado e da caatinga (Golfari, Caser e Moura, 1978).

O *E. camaldulensis* possui um porte ereto. Ele é geralmente encontrado com alturas em torno de 20 metros, excedendo, às vezes, os 45 metros, enquanto seu diâmetro varia em torno de 1 a 2 metros, chegando a alcançar até 4 metros. Apresenta uma copa densa e um crescimento muito rápido (Lama Gutierrez, 1976).

A casca é geralmente aderida à base do tronco, adquirindo uma coloração irregular de cinza variando do branco ao camurça, com manchas cinzas e avermelhadas. É ligeiramente lisa, soltando-se em forma de tiras ou lascas irregulares. Suas folhas, quando ainda plântulas, são opostas em torno de 4 a 6 pares, sendo alternadas, pecioladas, largo-lanceoladas, elípticas ou ovóides, de coloração verde a verde acinzentado ou azulado. Em uma fase intermediária as folhas são alternadas, pecioladas, lanceoladas, de coloração verde ou esverdeada. Na fase adulta, as folhas são alternadas, pecioladas, pouco lanceoladas, de coloração verde a esverdeado (Boland et al., 1984).

Sua madeira tem coloração avermelhada, com uma textura fina e entrelaçada, densidade entre média e alta, sendo muito durável e resistente ao cupim. É usada para fabricação de celulose em Israel, Itália e Marrocos, e ainda na medicina, indústria e produção de óleos essenciais. Apresenta-se como excelente madeira de fogo, utilizada na fabricação de carvão; como estacas, postes e vigas para construção civil, produção de chapas de fibra e aglomerados (Golfari, Caser e Moura, 1975; Lama Gutierrez, 1976).

### 2.7.3 *Eucalyptus citriodora*: origem e caracterização

Segundo Boland *et al.* (1984), o *Eucalyptus citriodora* é uma espécie de ocorrência natural na Austrália, pertence à família Mirtaceae e ao sub gênero *Corymbia*; também é conhecida como "Lemon-Scented Gum", sendo caracterizada por apresentar um porte médio, chegando, algumas vezes, a 50 m de altura e 1,2 m de diâmetro. Sua madeira apresenta alta densidade (0,99 g/cm<sup>3</sup>) e é indicada para plantios visando usos múltiplos. A espécie ocorre basicamente em duas áreas de Queensland. A primeira e maior delas, ao Sul, estende-se de Maryborough a Mackay, até 400 km interior; e a Segunda, mais ao norte, compreende a região de Atherton, Herberton e Mt. Garnet. Entre estas duas principais áreas, a sua ocorrência é menor e descontínua.

Os primeiros estudos realizados com o gênero *Eucalyptus* iniciaram-se em 1904, realizados por Edmundo Navarro de Andrade, na ex-Companhia Paulista de Estradas de Ferro, no Estado de São Paulo, com o objetivo de selecionar espécies potenciais para a produção de madeira. A partir de 1915, o Instituto Florestal do Estado de São Paulo estabeleceu programas de estudos silviculturais para os eucaliptos. Em 1941, a Secção de Genética do Instituto Agrônomo de Campinas deu início aos estudos com intuito de elaborar um programa de melhoramento genético de eucaliptos, os quais tinham como objetivos melhorar a uniformidade das plantações, aumentar a taxa de sobrevivência, melhorar características de forma do tronço, crescimento em altura e diâmetro, capacidade de brotação, além de aumentar a produção por unidade de área (Ferreira e Santos, 1997).

Segundo estes, a partir de 1960, a pesquisa florestal foi consolidada e expandida. Nesta época, foram criados os primeiros cursos de Engenharia Florestal e o Programa de Incentivos Fiscais ao Reflorestamento, instituído pelo

Governo Federal. Em seguida, foram criadas cooperativas de pesquisas na área florestal, as quais estavam associadas as faculdades de Engenharia Florestal.

Segundo Gurgel and Cavalcanti (1983) a ex- Companhia. Paulista de Estradas de Ferro iniciou a produção de sementes de eucaliptos em 1916, e desde então já haviam sido comercializadas cerca de 87 toneladas de sementes. No período de 1966 a 1975, 1,5 a 3 toneladas de sementes foram vendidas a cada ano, e baseando-se no total de sementes vendidas, as espécies de eucaliptos consideradas mais importantes no estado de São Paulo eram o *E. grandis*, e *E. saligna*, que juntas representavam 60% do total de sementes comercializadas. Em seguida, estavam o *E. urophylla* e *E. citriodora*, que somavam 24%; o *E. tereticornis*, *E. paniculata*, *E. robusta*, *E. camaldulensis* e *E. maculata*, correspondiam a 14%, enquanto os 2% restantes eram representados por outras 28 espécies.

Ferreira *et al.* (1997) citam que em 1960, no Brasil, estimava-se existir cerca de 700.000 hectares cultivados com eucalipto, em sua maioria *E. saligna* e *E. grandis* (nas regiões sub-tropicais) e *E. urophylla* e *E. citriodora* (nas regiões tropicais).

## 2.8 Fungicidas Naturais

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

A partir de 1960, foram constatadas resistência de fungos a fungicidas. Paralelamente, esta época coincide com a introdução de novos compostos que agem em sítios específicos (fungicidas sistêmicos) do patógeno, visando ao

tratamento curativo e erradicante de doenças de plantas (Kimati, 1987 e Eckert, 1994).

Os fungicidas convencionais que interferem em vários sítios metabólicos do patógeno precisam provocar várias modificações no seu genoma para desencadear o processo de resistência. Por outro lado, fungicidas inibidores de sítios específicos, ou seja, os fungicidas sistêmicos, têm um alto grau de especificidade bioquímica e inibem somente um ou poucos sítios específicos no patógeno, sendo, então, mais comum o aparecimento de resistência devido à mutação em apenas um gene ser suficiente para diminuir a afinidade com o fungicida (Koller e Sheinpflug, 1987).

Os compostos fungicidas podem matar os fungos ou apenas inibir temporariamente a germinação de esporos, inibindo o crescimento fúngico, razões pelas quais são denominados de agentes fungistáticos. Há os agentes antiesporulantes, que são compostos químicos que inibem ou previnem a produção de esporos, sem afetar o crescimento micelial do fungo (Cruz Filho e Chaves, 1979).

Com o decorrer do tempo, os fungicidas evoluíram em vários aspectos, como: diminuição da toxicidade, doses, tipos de formulações, retiradas de compostos altamente nocivos ao homem e ao meio ambiente e o surgimento de maiores informações. No entanto, ainda assim muitos problemas têm surgido com o uso indevido de fungicidas sintéticos atualmente utilizados, dos quais se destacam: compostos, cujos produtos de degradação (os metabólitos) são muito tóxicos, persistência de resíduos no meio ambiente, desrespeito ao período de carência e aquisição de resistência (Zambolim *et al*, 2000).

Em função de todos estes fatores, vem aumentando a procura por produtos alternativos que sirvam como defensivos, que seriam todos os produtos químicos, biológicos, orgânicos ou naturais com as seguintes características: baixa ou nenhuma agressividade ao homem e à natureza, eficientes no combate

aos insetos e aos microorganismos nocivos, não favorecem a ocorrência de formas de resistência de pragas e microorganismos, custo reduzido para aquisição e emprego, simplicidade quanto ao manejo e aplicação e alta disponibilidade para aquisição. Assim poderiam ser enquadrados nesta categoria, os diversos biofertilizantes, as caldas, os agentes de biocontrole e os óleos essenciais (Fernandes, 2000).

## 2.9 Óleos essenciais com atividade fungicida

Vários trabalhos de Rouquayrol (1973), realizados com óleos essenciais de plantas do Nordeste Brasileiro, apresentaram atividade moluscida. Foram testados inicialmente 82 óleos, sobressaindo-se doze plantas por sua considerável atividade moluscida. Em um segundo teste, utilizaram, entre outras, *Eucalyptus citriodora* hook coletada em Ubajara-CE. Tanto no primeiro como no segundo ensaios mostraram atividade moluscida em baixas concentrações contra *Biomphalaria glabrata* em vários estágios de desenvolvimento, conferindo-lhes potencialidade no combate à esquistossomose mansônica.

A eficiência da erva medicinal *Cimnapogon citratus* (capim limão) no controle de fitopatógenos e de plantas daninhas em feijoeiro foi estudada por Valarini, Friguetto e Spadotto (1995). Estes comprovaram que o óleo essencial da planta a 10%, obtido das folhas, inibiu totalmente o crescimento micelial de *Fusarium solani* f. sp. *Phaseoli*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Rhizoctonia solani*. Além disto, observaram a inibição total da germinação de sementes de *Digitaria horizontalis* (capim colchão), *Sorghum halepense* (capim massambará), *Bidens pilosa* (picão preto) e *Euphorbia heterophylla* (amendoim bravo, leiteiro).

Lemos et al (1990), avaliando os óleos essenciais de dez plantas brasileiras quanto às suas atividades antimicrobianas, verificaram que o óleo essencial de *Lippia sidoides* exibiu grande atividade contra todos os

microorganismos testados, como *Saccharomices cerevisiae*, *Aspergillus flavus* e *Cryptococcus neoformans*.

Mishra and Dubey (1990), avaliando a fungitoxicidade de 9 plantas angiospérmicas, através de seus óleos essenciais, contra *Aspergillus flavus*, um fungo de armazenamento de muitos gêneros alimentícios e responsável pela produção de aflotoxinas, encontraram resultados bastante promissores.

### **2.10 Gêneros *Botrytis*, *Fusarium* e *Bipolaris***

O fungo *Botrytis cinerea* é um parasita facultativo, cosmopolita, causando danos principalmente em casas de vegetação e em plantas ornamentais, hortícolas e frutíferas e também em mudas de eucalipto. É o agente causal de doenças conhecidas como mofo cinzento, queima de botrytis e tombamento de mudas, atacando folhas, hastes e frutos. É considerada como uma das doenças mais comuns em cultivos protegidos. São sintomas causados por *B. cinerea*: manchas foliares, podridões da coroa e da copa, cancro das hastes, podridões de mudas, tombamentos, podridões de armazenamento de raízes, de rizomas e de frutos. Os tecidos feridos ou senescentes são especialmente susceptíveis à invasão pelo fungo. Lesões causadas por *B. cinerea* são facilmente identificadas, no campo, pelas suas características de esporulação e de mofo penugento. No tombamento de mudas de eucalipto, praticamente veêm-se infecções de *B. cinerea* com mais intensidade no estágio de fechamento de canteiros, sendo o patógeno que predomina neste estágio. Provavelmente, o que acontece é que a partir de outras fontes de inóculo e com auxílio de ventos, os conídios são disseminados e chegam até as copas das mudas nesse estágio. Em seguida, lavados pela irrigação ou pela chuva, caem sobre folhas mortas, na superfície dos recipientes, sob a copa entrelaçada das mudas, na qual se verifica a sua colonização saprofítica, seguindo-se intensa produção de estruturas reprodutivas



do fungo na superfície desse substrato. O controle fundamenta-se principalmente no emprego de fungicidas, cuja eficiência tem sido bastante limitada (Ferreira, 1989; Daughtrey, Wich and Peterson, 1995).

➤ Os fungos do gênero *Fusarium* são um dos mais importantes fitopatógenos do mundo, tendo nos últimos anos, em alguns países, adquirido importância também os produtores de micotoxinas responsáveis por doenças em animais e humanos. O Mal do Panamá, fusariose ou murcha de fusarium é causado pelo fungo *Fusarium oxysporum cubense*, que é um fungo de solo com alta capacidade de sobrevivência. Esta espécie está em todos os estados brasileiros produtores de banana, uma das frutas de maior consumo *in natura* do mundo, sendo que, no Brasil, é utilizada na alimentação básica. O controle químico, a rotação de culturas e a inundação, dentre outras medidas de controle, não têm sido eficientes (Ventura, 1999; Pereira et al, 1999).

O *Helminthosporium sativum*, que de acordo com sua nova taxonomia passou a ser denominado de *Bipolaris sorokiniana*, forma conidióforos solitários ou em pequenos grupos, retos ou flexuosos, marrom-escuros, contendo de 1 a 6 conídios inseridos acropleurogenamente. Os conídios são pardo-escuros, curvados ou retos, têm paredes espessas no centro e mais delgadas em direção aos ápices e são mais largos no centro. O tubo germinativo é do tipo semiaxial e origina-se a partir de uma ou de ambas as células polares do conídio. As colônias, em BDA, apresentaram a coloração pardo olivácea a muito escura, tornando-se geralmente mais claras nas bordas, cobertas com conídios pretos brilhantes, dando, assim, a aparência preta brilhante (Reis, Picinini e Fernandes, 1988) Algumas características observadas “in vitro” para *B. sorokiniana* foram correlacionadas à patogenicidade deste organismo. Na literatura disponível, há relatos de correlação entre a cor de conídios e o grau de patogenicidade (Chindabaram, Mathur and Neergard, 1973).

## **3 MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1 Estudo Fitoquímico**

Realizado no Laboratório de Química Orgânica do Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras-MG.

#### **3.1.1 Obtenção do Material Vegetal**

O gênero *Eucalyptus* possui basicamente óleo essencial concentrado em suas folhas; por esta razão, o trabalho foi desenvolvido com esta parte da planta.

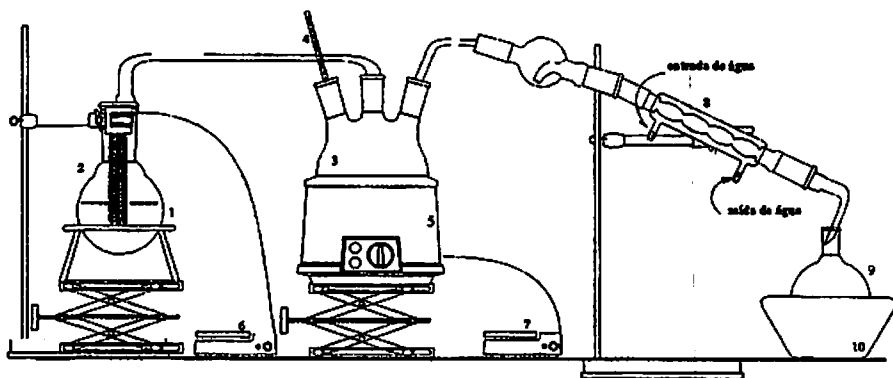
As folhas adultas da planta foram coletadas em março de 2000, por volta das 8:00h, com temperatura amena, em um mini-horto florestal de eucalipto que fica próximo ao Departamento de Engenharia Florestal, especificamente em frente ao Laboratório de Sementes da Universidade Federal de Lavras – UFLA, Lavras-MG.

As espécies coletadas foram identificadas como *Eucalyptus urophylla*, *Eucalyptus camaldulensis* e *Eucalyptus citriodora*. As folhas foram mantidas sob refrigeração para a extração do óleo essencial, no Laboratório de Química Orgânica do Departamento de Química - UFLA.

#### **3.1.2 Extração e determinação do conteúdo de óleo essencial**

As folhas foram picotadas e guardadas em saquinhos plásticos de 100 g sob refrigeração, para utilização das mesmas no decorrer das extrações. Estas foram submetidas à técnica de arraste de vapor de água, na qual o óleo essencial

foi extraído utilizando um recipiente com ebulidor (gerador de vapor) ligado a um regulador de tensão. O fluxo de vapor produzido passava pelo material vegetal fresco, dentro de um balão com capacidade para 500 mL, sendo, em seguida, condensado e recolhido em balão de 250 mL mantido em banho com água e gelo (fig.9). O volume ótimo de líquido condensado (emulsão de água/óleo – hidrolato) necessário para extrair todo o óleo essencial, foi de aproximadamente 1 litro, com fluxo de vapor ajustado para produzir tal volume em 4 horas. Utilizou-se diclorometano para extração (3x80 mL) .Reuniram-se as frações orgânicas, adicionou-se sulfato de magnésio anidro, filtrou-se e levou ao evaporador , sob pressão reduzida, obtendo-se o óleo puro.



1,2-balão de boca larga com fonte de aquecimento para ferver água e gerar vapor;

3- balão de fundo redondo com três bocas. Neste foram colocadas as folhas verdes

4-termômetro

5- manta aquecedora

6,7- termostatos

8- condensador

9- recipiente para receber o hidrolato

10- cuba com gelo

Figura 9 - Representação esquemática do equipamento adaptado para extração de óleo essencial por arraste de vapor

### 3.1.3 Identificação dos constituintes do óleo essencial

Os espectros no infravermelho dos óleos essenciais foram obtidos utilizando-se o espectrômetro FTIR modelo- 8201 A-Shimadzu, utilizando-se janelas de NaCl como suporte.

Para identificação dos compostos majoritários do óleo essencial, utilizou-se um cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de massa (CG-EM) equipado com uma coluna capilar com fase apolar (chromosob W/1/4''x 2M). Os compostos foram identificados através de seus espectros de massas e comparados com aqueles existentes no banco de dados do aparelho.

### **3.2 Análise da Atividade Biológica**

Realizado no Laboratório de Controle de Enfermidade do Departamento de Fitopatologia da UFLA.

#### **3.2.1 Avaliação do efeito sobre o crescimento micelial dos óleos essenciais sobre os fitopatógenos**

A atividade fungitóxica dos óleos essenciais de folhas das espécies de eucalyptus em estudo foi avaliada sobre os fungos *Fusarium oxysporum* f. sp. *Gladioli*, *Bipolaris sorokiniana* e *Botrytis cinerea*, da classe Deuteromycotina. As culturas utilizadas para o teste foram obtidas na micoteca do Departamento de Fitopatologia da UFLA. O método utilizado foi o bioanalítico "in vitro", comparando-se o crescimento ou a inibição do micélio nas concentrações de 5, 50 e 500 ppm dos óleos essenciais, utilizando-se como substrato, BDA (batata, dextrose, ágar) e PCA (batata, cenoura, ágar).

Os experimentos foram desenvolvidos, em uma capela asséptica de fluxo laminar, na qual as diferentes concentrações de 0, 5 µL, 50µL, 500µL do óleo em estudo foram colocadas no meio BDA para os fungos *Fusarium oxysporum* e *Bipolaris sorokiniana* e PCA para o fungo *botrytis cinerea*, ainda líquidos, através de pipeta automática com ponteiros descartáveis. Verteu-se a solução em placas de Petri previamente esterilizadas. A seguir, cada placa recebeu um disco

micelial de 0,5 cm de diâmetro das respectivas culturas de fungos crescidas em meio BDA (*Fusarium oxysporum* e *Bipolaris sorokiniana*) e PCA (*Botrytis cinerea*), de modo que o micélio estivesse em contato com o meio de cultura, no centro da placa. As placas foram vedadas com filme plástico, identificadas e incubadas em câmara de crescimento, à temperatura de 20 a 22 °C, sob fotoperíodo de 12 h luz e 12 h escuro, por 8 dias aproximadamente (Santos,1996).

Foram realizados três experimentos separadamente, cada um deles contendo os tratamentos: T<sub>1</sub> – testemunha, T<sub>2</sub> – óleo essencial 5 ppm, T<sub>3</sub> – óleo essencial 50 ppm, T<sub>4</sub> – óleo essencial 500 ppm, em um delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições. Iniciaram-se as avaliações do experimento após 48 horas de montagem do mesmo, através de medições diárias do crescimento micelial, sendo que cada medição correspondeu à média de duas medidas diametralmente opostas da colônia fúngica, através de uma régua. O índice de crescimento micelial (ICM) ou a taxa de crescimento micelial (TCM) foi calculado pela fórmula modificada de Nakagava Maguire, adaptada por Oliveira (1991).

$$ICM = \frac{C1}{N1} + \frac{C2}{N2} \Lambda + \frac{Cn}{Nn}$$

onde

ICM = índice de crescimento micelial

C1, C2, Cn = crescimento micelial das colônias na primeira, segunda e última avaliação;

N1, N2, Nn = número de dias

O experimento foi analisado estatisticamente por regressão.

### 3.2.2 Avaliação do efeito dos óleos essenciais das folhas de *Eucalyptus* sobre a germinação de esporos de *Fusarium oxysporum*, *Bipolaris sorokiniana* e *Botrytis cinerea*

Adotou-se o método bioanalítico “*in vitro*” de inibição de germinação de esporos. Foram utilizadas colônias jovens de fungos fitopatogênicos. Nestes testes, utilizaram-se óleos essenciais de folhas de *Eucalyptus*. Para avaliar a germinação de esporos, foram utilizadas lâminas escavadas (25 x 75 mm) utilizadas em microscopia. Sobre cada lâmina, adicionou-se uma gota de 20 µL de uma suspensão na concentração de  $3 \times 10^5$  esporos/ml, obtendo-se assim a concentração desejada e 20 µL do óleo essencial a 5, 50, 500 ppm. A avaliação foi realizada após 6 horas de incubação em câmara úmida a 22 °C ±2. Determinou-se a porcentagem de germinação em microscópio ótico (aumento 250x), em 10 campos por gota. Foram considerados germinados aqueles que apresentaram tubo germinativo, independente de seu comprimento. Os resultados foram expressos em porcentagem de germinação, em um delineamento inteiramente casualizado com 4 repetições. A porcentagem de germinação foi determinada segundo a seguinte fórmula:

$$\text{Porcentagem de germinação: } \frac{\text{Número de esporos germinados}}{\text{Número de esporos observados} \times 100}$$

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Obtenção e caracterização dos óleos essenciais

Foi avaliado o teor e caracterizado quimicamente o óleo essencial das folhas dos *Eucalyptus citriodora*, *camaldulensis* e *urophylla*, pois devido aos seus aromas naturais, acreditou-se que esses materiais poderiam apresentar óleos essenciais na sua composição. Os óleos essenciais das três espécies de eucaliptos apresentaram um bom rendimento em peso: 1,6% para o *E. citriodora*, 1,2% para o *E. camaldulensis* e 1,1% para o *E. urophylla*. Embora pareça um rendimento muito baixo, está dentro da faixa aceitável, pois são consideradas ricas em essências as plantas que apresentam rendimento acima de 1%, embora estes teores sejam característicos de cada parte da planta e de cada espécie vegetal. (Vitti, 1999). Os espectros de Infravermelho representados pelas FIGURAS 10, 11 e 12 são bastante similares. Nestes, observa-se uma banda larga compreendida entre  $3200 - 3600 \text{ cm}^{-1}$ , característica de estiramentos simétricos e assimétricos da ligação OH. Na região compreendida entre  $2700 - 3000 \text{ cm}^{-1}$ , a presença de um sinal forte evidencia os grupos metílicos ( $-\text{CH}_3$ ), metilênicos ( $-\text{CH}_2$ ) e metínicos ( $-\text{CH}$ ) presentes. Estes também podem ser evidenciados pelo sinal de deformação angular que aparece em  $1480$  (FIG. 10),  $1456$  (FIG. 11) e  $1430 \text{ cm}^{-1}$  (FIG. 12). Próximo a  $1732 \text{ cm}^{-1}$  (fig. 12),  $1726 \text{ cm}^{-1}$  (FIG. 10) e  $1750 \text{ cm}^{-1}$  (FIG. 11), encontram-se as bandas de absorção que são atribuídas aos estiramentos simétricos e assimétricos do grupo carbonila ( $-\text{C}=\text{O}$ ). Detectou-se a presença de um sinal em  $1163 \text{ cm}^{-1}$  (FIG. 10),  $1180 \text{ cm}^{-1}$  (fig. 11) e  $1140 \text{ cm}^{-1}$  (FIG. 12), característico do estiramento C-O, de álcoois secundários e terciários, evidenciando a presença do terpinol (FIG. 20), constatado pelo CG/EM (Silvertein, Morrill and Baster, 1994).



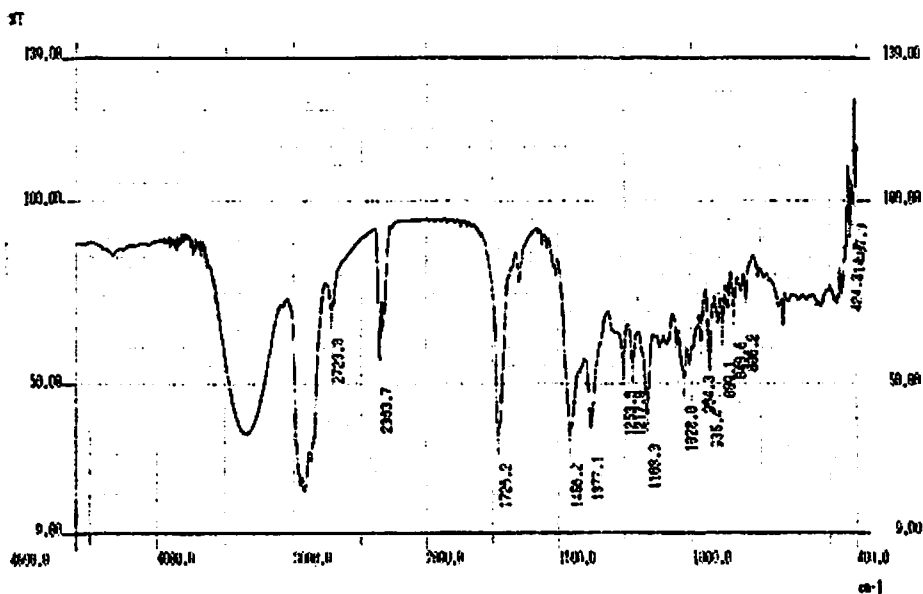


FIGURA 10 - Espectro de Infravermelho do óleo essencial das folhas de *E. citriodora*

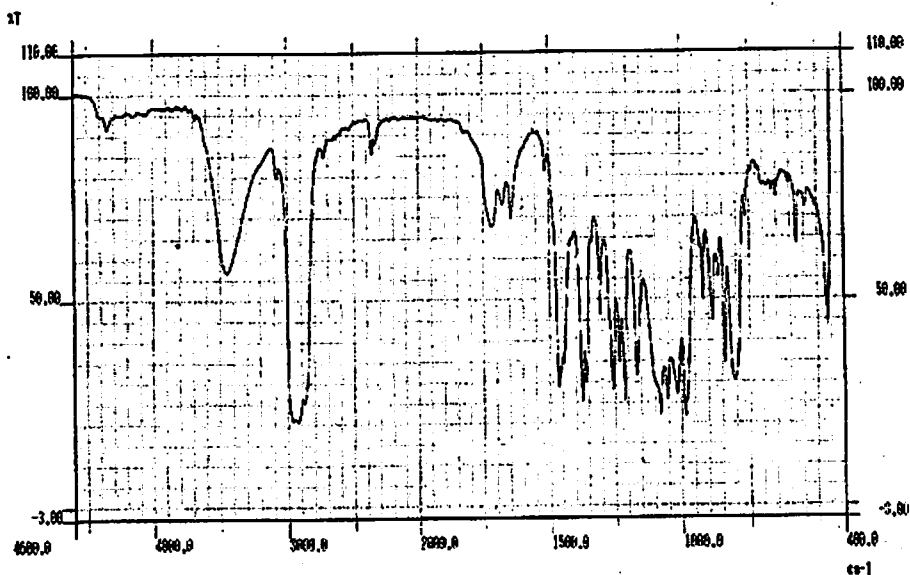


FIGURA 11 - Espectro de Infravermelho do óleo essencial das folhas de *E.camaldulensis*

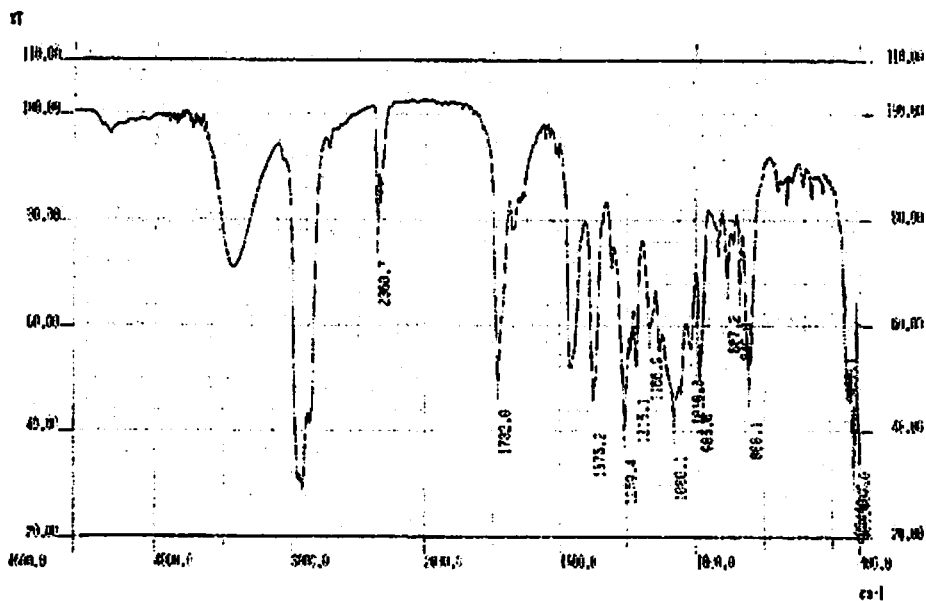


FIGURA 12 – Espectro de infravermelho do óleo essencial das folhas de *E. urophylla*

O cromatograma do óleo essencial das folhas de *E. citriodora* (FIG.13), mostra que ele apresenta uma composição de aproximadamente sete substâncias químicas diferentes (TAB.2), e entre elas a mais abundante foi o citronellal (FIG. 14), com tempo de retenção (Rf) igual a 17,35 min(FIG.15), com uma área de 57,04% do total e com 78% de chances do composto ser igual ao do banco de dados do aparelho. Existe uma probabilidade de 97% de o pico de retenção verificado aos 22,00 min. de corrida (FIG.16) ser referente à substância benzeno 1,2 – dimethoxy-4-(2-propenyl) (FIG.17), com 97%.

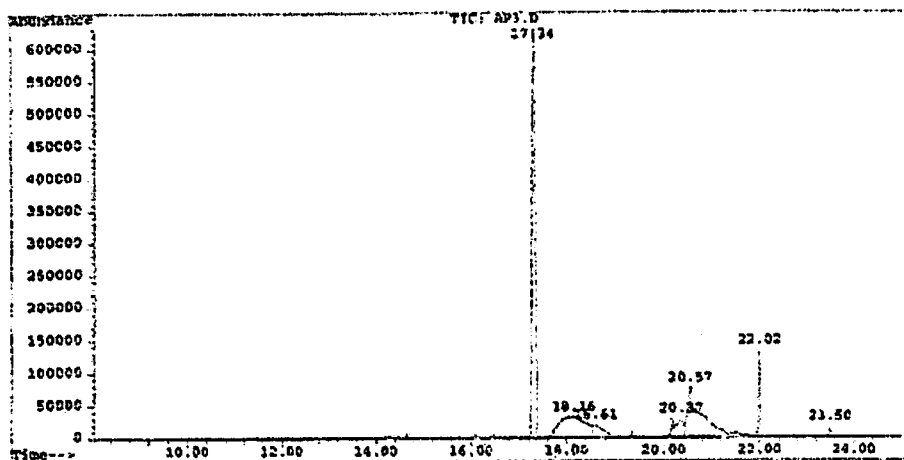


FIGURA 13 – Cromatograma do óleo essencial das folhas do *Eucalyptus citriodora*

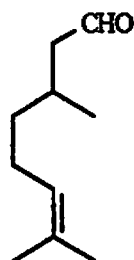


FIGURA 14: Citronelal

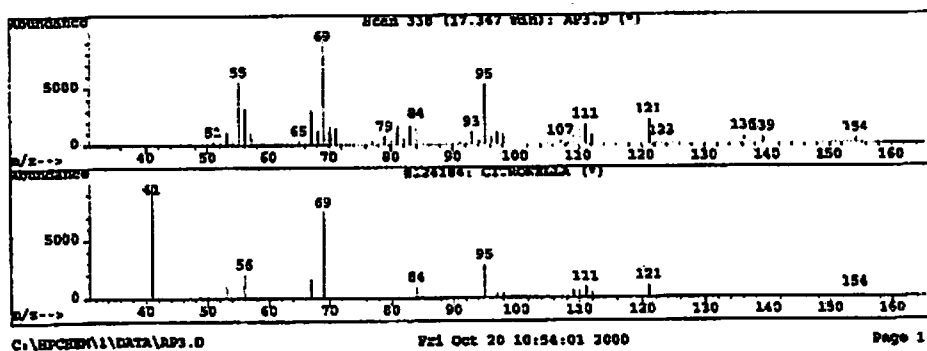


FIGURA 15 – Espectro de massa do pico Rt = 17,35

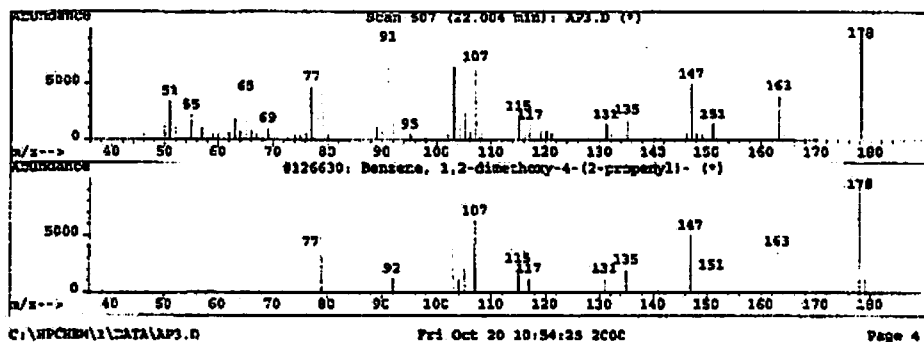
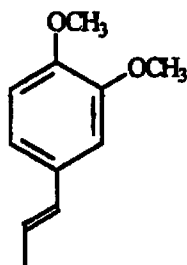


FIGURA 16 – Espectro de massa do pico Rt = 22,00

TABELA 2 - Substâncias majoritárias do óleo essencial das folhas de *E.citriodora* sugeridas pelo CG/EM

Rf	Área %	Banco de dados	Ref	Qual
17.35	57.04	Citronelal	124184	78
		Citronelal	124183	70
18.16	13.38	1,2 epoxy nona	10231	35
		Isopulegol	124287	35
20.57	24.34	1,5 heptadieno	125692	50
22.00	5.24	2,3,6 trimetil		
		Benzeno 1,2 dimetoxi- 4 - propenil 1	143689	97



1,2-dimetoxi-4-(2-propenil)-benzen

FIGURA 17: Estrutura do 1,2-dimetoxi-4-(2-propenil)-benzeno

No cromatograma do óleo essencial do *E. camaldulensis* (FIG. 18), dez diferentes substâncias foram encontradas e determinadas, segundo o banco de dados do CG-EM, sendo que as majoritárias estão apresentadas na TABELA 3. Analisando de um modo geral, verifica-se que os compostos são terpenos, conjuntamente com as funções ácidos carboxílicos, álcoois e aromáticos. Estes dados também podem ser constatados com aqueles encontrados no Infravermelho.

Através dos dados da TABELA 3, observaram-se duas substâncias majoritárias na constituição química do óleo essencial do *E. camaldulensis* que correspondem, juntas, a 30% do teor total, sendo que o citronelal (FIG 14) apresenta-se com 21,24% e o 1,8 cineol (FIG.19) corresponde a 8,82%. Outra substância identificada é o 1 -  $\alpha$  - terpineol (FIG.20), correspondendo ao pico 18,48, representando um teor de 7,77%. O citronelal apresenta um pico de tempo de retenção (Rt) de 17,38 min, cujo espectro é mostrado na FIG.21, cujo pico base  $m/2 = 69$  e o pico do íon molecular  $m/2 = 154$ . O  $\alpha$ - terpinol apresenta um Rt de 18,48 min (FIG. 22), sendo seu pico base  $m/2 = 59$  e o pico do íon molecular de 136. O 1,8 cineol apresenta o pico base  $m/2 = 55$ , o pico do íon molecular  $m/2 = 154$ .e seu Rt = 14,62 min. (FIG. 23). Todas estas estruturas estão de acordo com os espectros contidos no banco de dados do CG/EM e

correspondem a aproximadamente 90%, 80% e 50% de chances de serem compatíveis com os dados do aparelho.

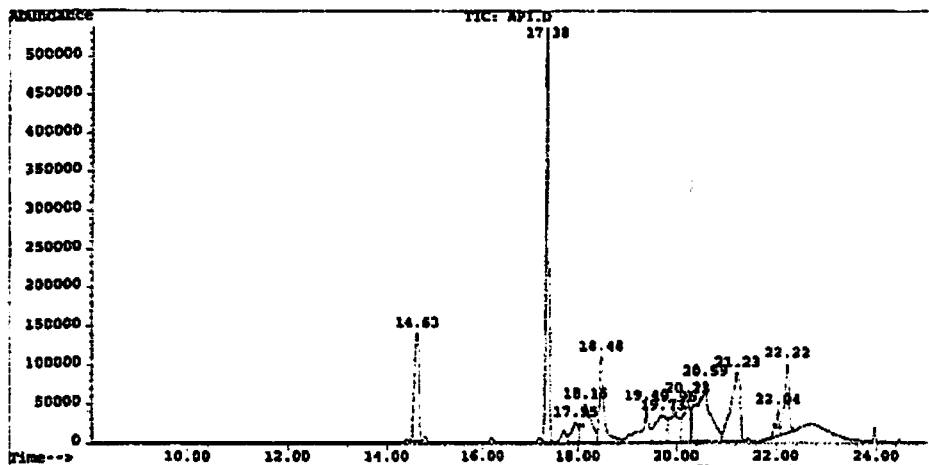
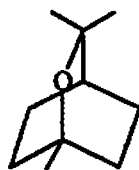
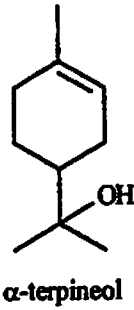


FIGURA 18 – Cromatograma do óleo essencial das folhas de *Eucalyptus camaldulensis*

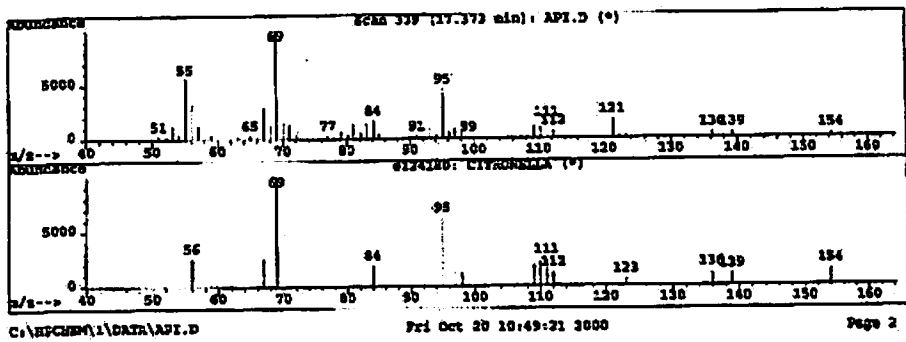


1,8-cineol

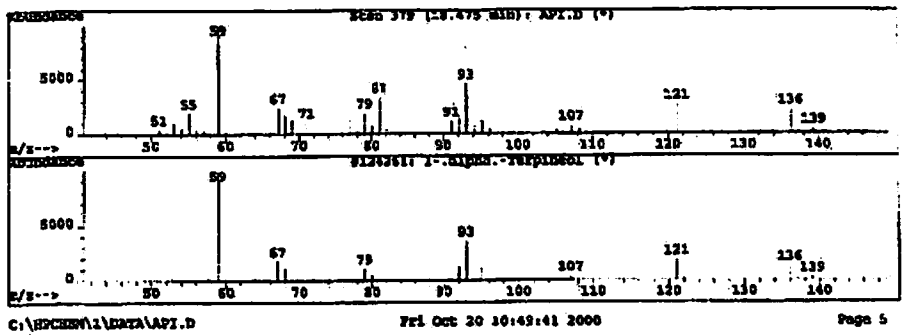
FIGURA 19: Estrutura do 1,8-cineol



**FIGURA 20: Estrutura do  $\alpha$ -terpineol**



**FIGURA 21 – Espectro de massa do pico Rt=17,38**



**FIGURA 22 – Espectro de massa do pico Rt=18,48**





as possíveis substâncias majoritárias, nomeadas pelo banco de dados do CG-MS. Um dos compostos presentes é o globulol (FIG. 25), com 41% do total, tendo como tempo de retenção (Rt) 18,39 min., cujo espectro de massas é mostrado na FIG. 26 (Pico molecular  $m/2 = 223$ ) e 40% de chances de ter o espectro de massas igual ao do globulol, presente no banco de dados do aparelho. Temos ainda o citrônella (FIG. 14), que perfaz 5,48% do total dos constituintes, com tempo de retenção (Rt) igual a 17,34 (FIG. 27) e 95% de chances de ser igual ao banco de dados do aparelho. E como um terceiro constituinte, o  $\alpha$ -3-ciclohexano 1 metanol (mircenol) (FIG. 28), com 17,48% do total, Rt=21,04 e 43% de chances de ser igual ao banco de dados do aparelho.

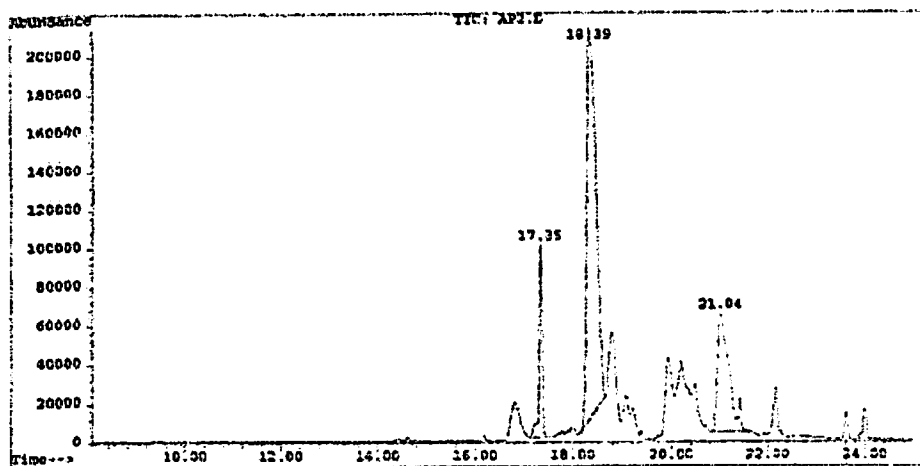
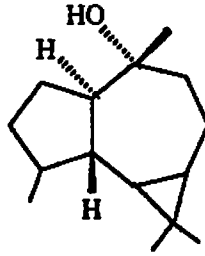


FIGURA 24 Cromatograma do óleo essencial das folhas de *E urophylla*



Globulol

FIGURA 25: Estrutura do Globulol

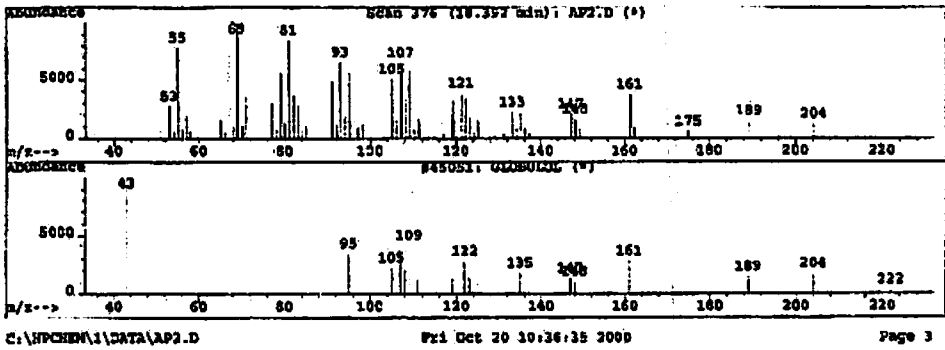


FIGURA: 26 – Espectro de massa do pico Rt=18,39

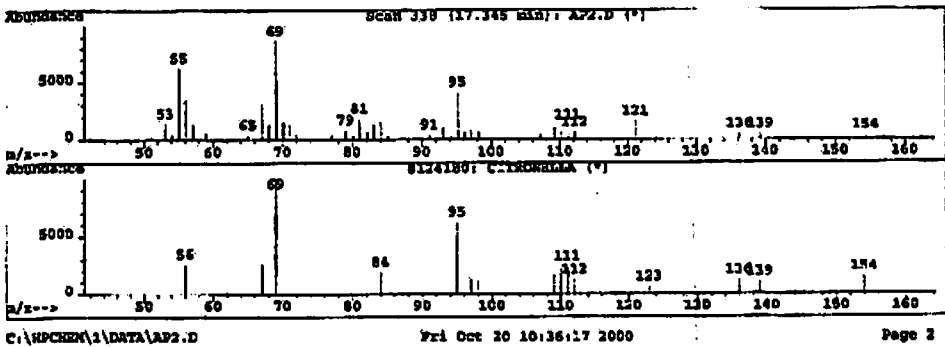
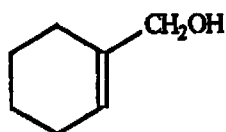


FIGURA 27 – Espectro de massa do pico Rt = 17,34



3-cicloexeno-metanol-1

FIGURA 28: Estrutura do 3-cicloexeno-metanol-1

TABELA 4 – Substâncias majoritárias do óleo essencial das folhas de *E. wrophylla* sugeridas pelo CG-MS

Rt	Área	Banco de dados	Ref	Qual (%)
20.21	8.58	1,6 heptadieno 3,5 dimetil	4890	43
20.49	4.60	Citronelal	124184	43
21.04	17.48	$\alpha$ -3 cicloexeno 1 metanol (mircenol)	124246	40
		Mircenol	124224	43
17.34	5.48	Citronelal	124180	95
		Citronelal	124184	90
18.39	41.00	Globulol	45051	43
18.81	7.09	Cis-farnesol	44953	45

Vimos que nos cromatogramas apresentados pelas FIGS. 13 e 18 , há a predominância de um composto com tempo de retenção (Rt) igual a 17,38 min. Este foi identificado como citronelal (FIG. 14), enquanto, no *E. wrophylla*, representado pelo cromatograma da FIG.24, o composto de maior quantidade é o

que tem o tempo de retenção (Rt) igual a 18,39 min., e foi identificado como globulol (FIG.25).

## 4.2 – Atividade biológica

### 4.2.1. Avaliação das diferentes concentrações dos óleos essenciais das folhas de *E. citriodora*, *E. camaldulensis* e *E. urophylla* na inibição micelial de *B. cinerea*, *F. oxysporum* e *B. sorokiniana*

Através das FIGURAS 29, 30 e 31, podemos observar que para os três gêneros de fungo *B. cinerea*, *F. oxysporum*, e *B. sorokiniana*, a maior taxa de inibição do crescimento micelial ocorreu com o óleo essencial de *E. urophylla*. Houve uma inibição do crescimento micelial significativa em todas as espécies na concentração de 500 ppm. Para a espécie *B. cinerea* (FIG. 29), podemos constatar que não houve diferença significativa no crescimento micelial com as concentrações de 5 e 50 ppm de óleo para todas as espécies de eucaliptos, entretanto, a 500 ppm, o óleo essencial que apresentou maior atividade antifungos foi o obtido da espécie *E. urophylla* apresentando uma grande inibição, confirmada pelas FIGURAS 29, 32, 33 e 34.

Para o gênero *F. oxysporum* (FIG.30), não houve diferença entre a testemunha e as concentrações de 5 e 50 ppm utilizando o óleo das três espécies de eucaliptos, no entanto observou-se uma pequena diferença para 500 ppm com as espécies *E. camaldulensis* e *E. citriodora* e uma grande diferença para os óleos da espécie *E. urophylla*. Observou-se uma mudança de coloração a 500 ppm, a placa tornou-se rosa mais escuro. Como as substâncias encontradas nos óleos apresentam grupo alcoólico, carbonilas e duplas ligações, pressupõe-se que houve uma oxidação, ou os compostos foram metabolizados em outras substâncias, provocando a inibição dos gêneros de fungos.

Causas de variação	Graus de liberdade(GL)	QM
Fungo	2	7.7418792 **
Eucalipto	2	8.3077126 **
Concentração	3	22.7052796 **
Fungo*Eucalipto	4	1.6502063 **
Fungo*Concentração	6	0.1985404 *
Eucalipto*Concentração	6	1.7738182 **
FUN*BUC*CONC	12	0.4239590 **
Resíduo	108	0.0859259 **
Total	143	

\* nível de 5%      \*\* nível de 1%

TABELA 5 - Quadro de análise de variância

Para o género de fungo *B. sorokiniana* (FIG.31), não houve diferença nenhuma entre a testemunha e a concentração de 5 ppm, permanecendo praticamente iguais, aparecendo uma diferença pequena para 50 ppm e uma grande diferença para 500 ppm, para o qual não houve crescimento quando se utilizou o óleo essencial das folhas de *E. camaldulensis*. Os resultados se repetiram para as espécies *E. citriodora* e *E. wrophylla*. Entretanto, a 500 ppm, com o óleo da espécie *E. wrophylla*, a inibição foi alta, repetindo o resultado dos dois géneros anteriores. Com isto, pressupõe-se que a substância globulol, presente em quantidades majoritárias no *E. wrophylla*, é que está provocando este tipo de inibição, enquanto, nas espécies *E. citriodora* e *E. camaldulensis*, as substâncias citronelal, 1,8 cineol e  $\alpha$ -terpinol são as responsáveis pela inibição.

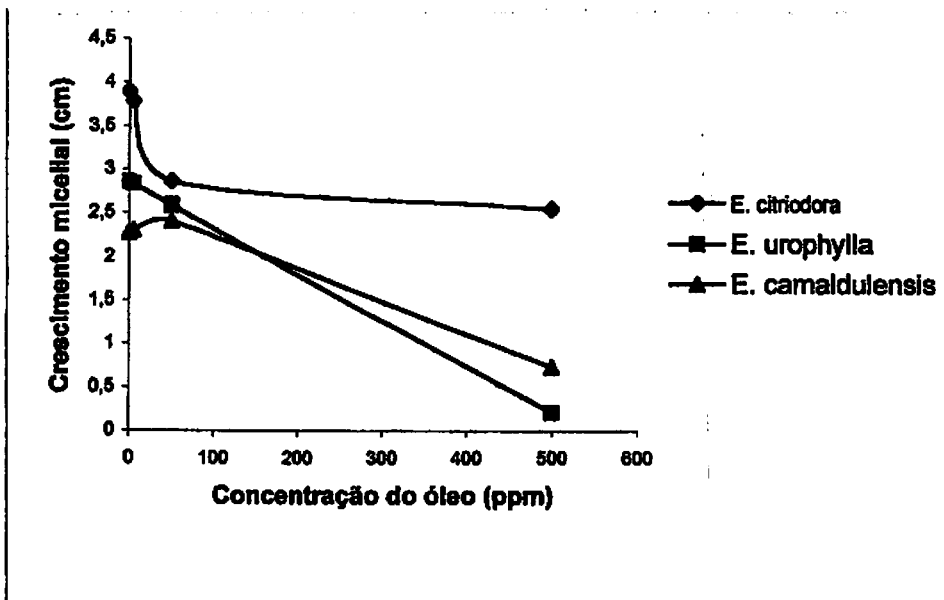


FIGURA 29: Crescimento micelial em diferentes concentrações do fungo *B. cinerea*

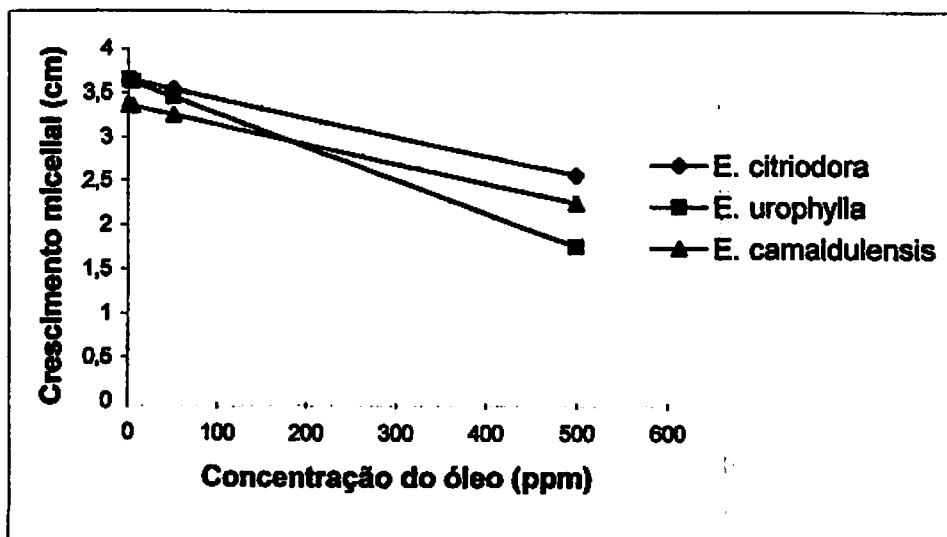


FIGURA 30: Crescimento micelial em diferentes concentrações do fungo *F. oxysporum*

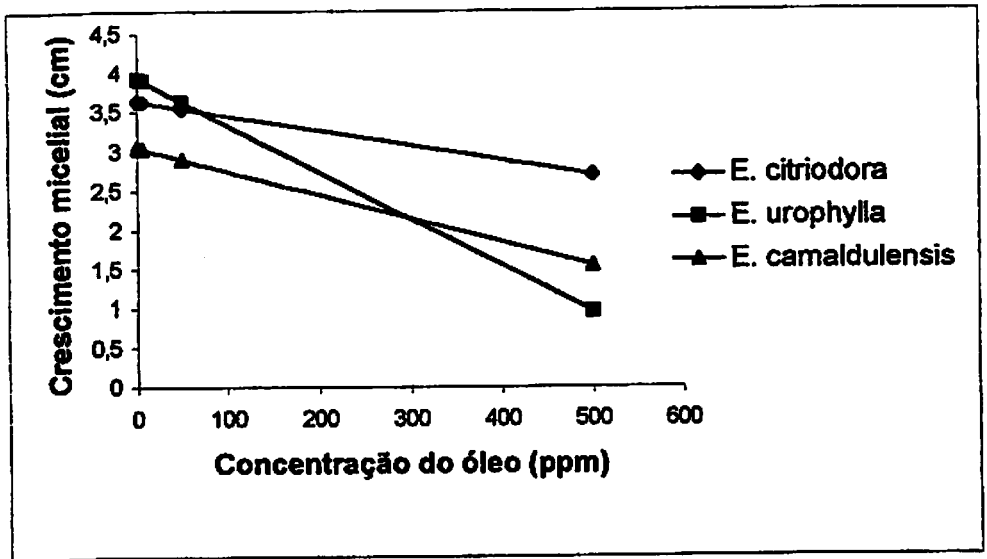


FIGURA 31: Crescimento micelial em diferentes concentrações do fungo *B. sorokiniana*.

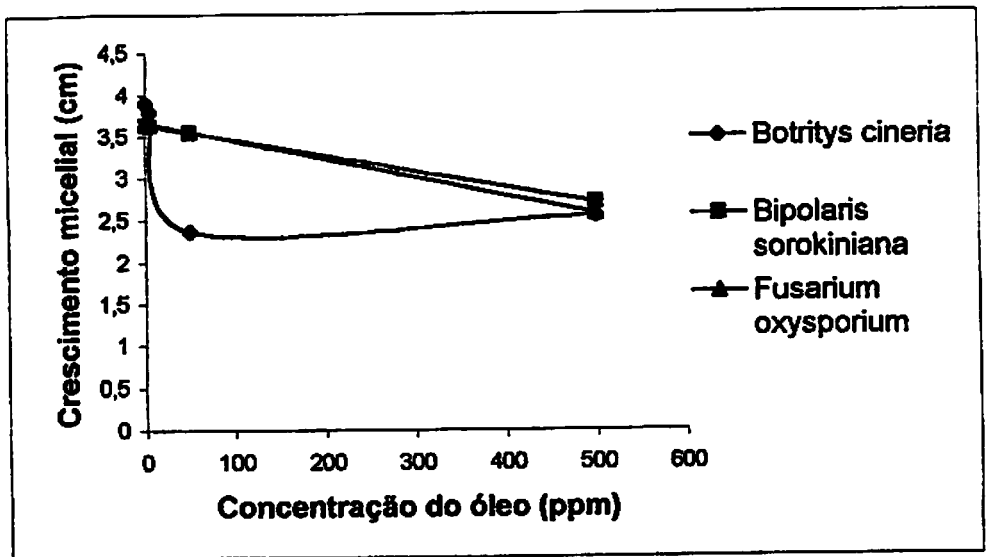


FIGURA 32: Crescimento micelial em diferentes concentrações do óleo essencial de *E. citriodora*:

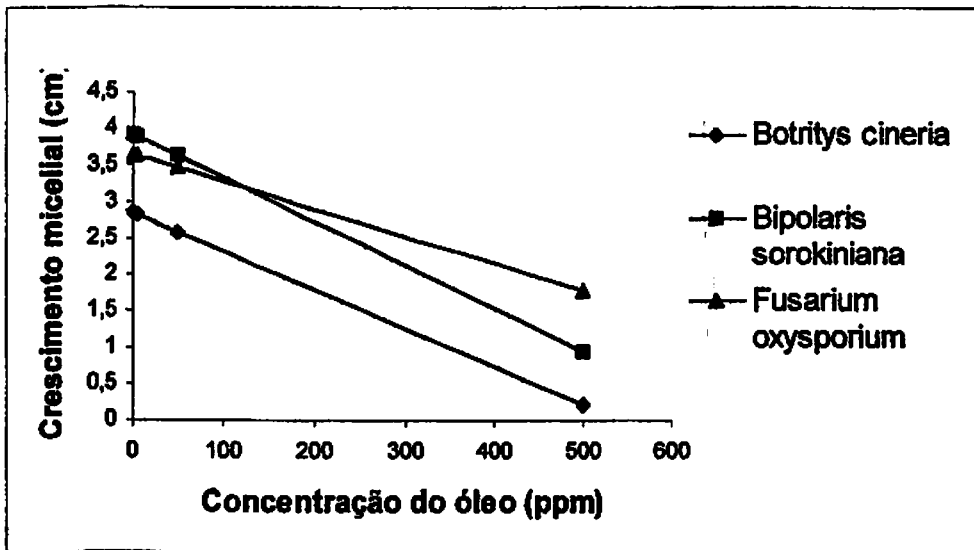


FIGURA 33: Crescimento micelial em diferentes concentrações do óleo essencial de *E. urophylla*.

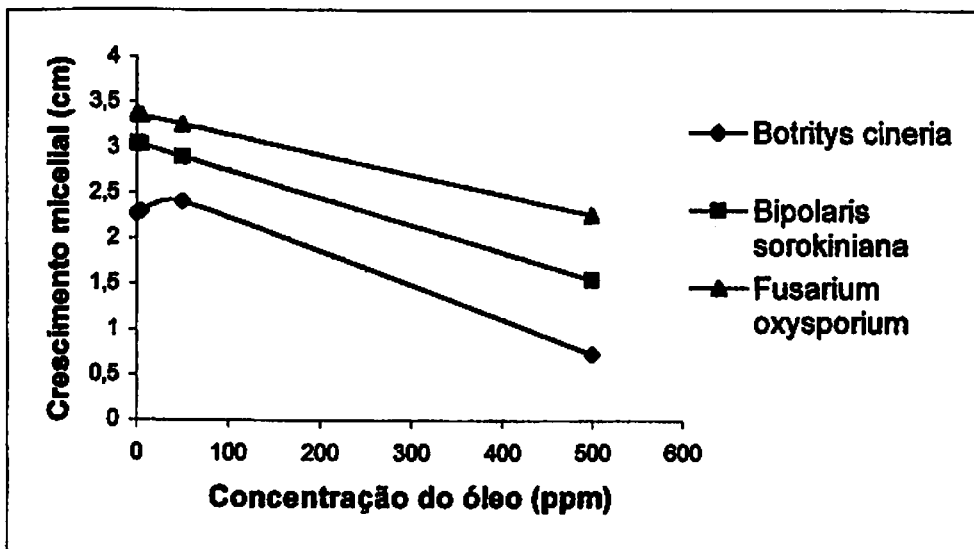


FIGURA 34: Crescimento micelial em diferentes concentrações do óleo essencial de *E. camaldulensis*



## 5 CONCLUSÕES

No estudo dos óleos essenciais das três espécies de eucalipto, verificou-se que o globulol foi o composto de maior abundância no *Eucalyptus urophylla*, enquanto, no *Eucalytus citriodora* e *Eucalyptus camaldulensis*, os compostos de maior intensidade encontrados foram o citronelal e o 1,8 cineol. Com isto, podemos inferir que o globulol apresentou maior inibição sobre o crescimento micelial dos três gêneros de fungo na concentração de 500 ppm.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, E.N. **O eucalipto** 2.ed. São Paulo: Companhia Paulista de Estradas de Ferro. 1939. 121p.
- COLAND, D.J.; BROOKER, M.I.H.; CHIPPEMDALE, G.M.; HALL, N.; HYLAND, B.P.M.; JOHNSTON, R.D.; KLEINIG, D.A.; TURNER, J.D. **Forest trees of Australia** 4.ed. Melbourne: Nelson - CSIRO, 1984. 687p.
- COLAND, D.J.; BROPHY, J.J.; HOUSE, A.P.N. **Eucalyptus leaf oils - use, chemistry, distillation and marketing**. Melbourne: INKATA; ACIAR; CSIRO, 1991. 247p.
- BONATO, P.S. Cromatografia gasosa. In: COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Introdução a métodos cromatográficos**. Campinas: UNICAMP, 1990. cap.8, p.141-79.
- CHARLES, D.J.; SIMON, J.E. Comparison of extraction methods for the rapid determination of essential oil content and composition of basil. **Journal of American society of Horticultural Science**, Alexandria, v.115, n.3, p.458-62, May 1990.
- CHIDABARAM, P.; MATHUR, S.B.; NEERGARD, P. Identification of seed borne *Dreschlera* species. **Friesia**, Copenhagen, v.10, p.165-207, 1973.
- CORRÊA JÚNIOR, C.; LIN, C.M.; SHEFFER, M.C. A importância do cultivo de plantas medicinais, aromáticas e condimentares. **SOB informa**, v.9, n.2, p. 23-24, 1991.
- DAUGHTREY, M.L.; WICK, R.L.; PETERSON, J.L. **Compendium of floweringpotted diseases** St Paul: APS Press, 1995. 90p.
- DORAN, J.C.; BROPHY, J.J. Tropical red gums - a source of 1,8-cineole-rich *Eucalyptus* oil. **New Forest**, Dordrecht, n.4, p.157-178, 1990.
- FAO. **Eucalyptus for planting**. Roma, 1981. 677p.
- FAWCETT, C.H.; SPENCER, D.M. Plant chemotherapy with natural products. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.18, p.403-18, 1970.
- FRANDES, M.C.A. Emprego de métodos alternativos de controle de pragas e doenças na olericultura. In: CONGRESSO IBERO-AMERICANO SOBRE UTILIZAÇÃO DE PLÁSTICO NA AGRICULTURA, 2.; SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE PRODUÇÃO DE PLANTAS MEDICINAIS, AROMÁTICAS E CONDIMENTARES 1.,

- 2000, São Pedro, SP. **Trabalhos apresentados e palestras...** Brasília: SOB/FCAV-UNESP, 2000. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.18, p.110-112, 2000. Suplemento.
- FERREIRA, F.A. **Patologia Florestal: principais doenças no Brasil**. Viçosa: Sociedade de Investigações Florestais, 1989. 570p.
- FERREIRA, M.; SANTOS, P.E.T. **Melhoramento genético florestal dos Eucalyptus no Brasil, breve histórico e perspectivas**. In: IUFRO CONFERENCE ON SILVICULTURE AND IMPROVEMENT OF EUCALYPTUS, 1997, Salvador. **Anais...** Colombo: EMBRAPA, CNPF, 1997. v.1, p.14-34.
- GOLFARI, L. **Zoneamento ecológico do Estado de Minas Gerais para reflorestamento**. Belo Horizonte: PRODEPEF, 1975. 65p (Série Técnica, 3).
- GOLFARI, L.; CASER, R.L.; MOURA, V.P.G. **Zoneamento ecológico esquemático para reflorestamento no Brasil: (2ª aproximação)**. Belo Horizonte: PRODEPEF, 1978. 66p. (Série Técnica, 11).
- GROS, E.G.; POMILIO, A.B.; SELDES, AM. et al. **Introducción al estudio de los productos naturales**. Washington, DC: Secretaria General da la OEA, 1985. 146p.
- GURGEL, J.T.A.; CAVALCANTI, G.R.A. **Eucalyptus seed production by FEPASA, State of São Paulo, Brazil**. *Silvicultura São Paulo*, v.32, p.788-791, 1983.
- HALL, N. **Botanists of the Eucalyptus**. Melbourne, Australia: CSIRO, 1978. 160p.
- JOHNSON, H.W. **The quantitative interpretation of gas chromatographic data**. *Advances in Chromatography*, New York, v.5, p.175-228, 1968.
- KIMURA, M.K. **Sensibilidade e Resistência "in vitro" de botrytis cinerea a fungicidas**. Lavras: UFLA, 1999. 132p.
- KOLLER, W.; SCHEINPLUG, H. **Fungal resistance to sterol biosynthesis inhibitors: a new challenge**. *Plant Disease*, St. Paul, v.71, n.12, p.1066-1074, Dec.1987.
- LAMA GUTIERREZ, G. de la. **Atlas del eucalipto**. Sevilla: Ministério da Agricultura, INIA/ICONA, 1976. v.1.
- LASSAK, E.V. **The Australian Eucalyptus oil industry, past and present**. *Chemistry in Australia*, Victoria, v.55, p.396-398, 1988.

EMOS, T.L.G.; MATOS, F.J.A.; ALENCAR, J.W.; CRAVEIRO, A.A.; CLARK, A.M.; McCHESNEY, J.D. Antimicrobial activity of essential oils of Brazilian plants. *Phytoterapy Research*, Chichester, v.4, n.2, p.82-84, 1990.

MANCINI, B. Influência de tempo de destilação na composição quali e quantitativa de óleos essenciais. I. Essência de Hortelã do Brasil. *Revista de Ciências Farmacêuticas*, Araraquara, v.6, p.1-7, 1984.

MARTINS, E.R. Morfologia interna e externa, caracterização isozimática e óleo essencial de *Ocimum selloi* Benth. Viçosa: UFV, 1996. 97p. (Dissertação - Mestrado em Fitotecnia).

MISHRA, A.K.; DUBEY, N.K. Fungitoxity of essential oil of *Amomum sublatum* against *Aspergillus flavus*. *Economic Botany*, New York, v.44, n.4, p.530-3, 1990.

MWANGI, J.W.; GUANTAI, A.N.; MURIUKI, G. *Eucalyptus citriodora* - Essential oil content and chemical varieties in Kenya. *East African Agricultural and Forest Journal*, Nairobi, v.46, n.4, p.89-96, 1981.

OLIVEIRA, J.A. Efeito de tratamento fungicida em sementes e no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativas* L.) e pimentão (*Capsicum anannum* L.). Lavras: ESAL, 1991. 111p. (Tese - Mestrado em Fitossanidade).

PENFOLD, AR.; WILLIS, J.L. The eucalyptus - botany, cultivation, chemistry and utilization. London: Leonard Hill, 1961. 550p.

PEREIRA, L.V.; ZILTON, J.M.C.; FIGUEIRA, A. dos R.; HINZ, R.H.; MATOS, A.P. de Doenças da bananeira. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, v.20, n.196, p.37-47, 1999.

REIS, E.M.; PICININI, E.C.; FERNANDES, J.M.C. Estratégias para o controle de doenças do trigo. Passo fundo: EMBRAPA-CNPT, 1988. 50p. (EMBRAPA-CNPT. Documentos, 7).

ROUQUAYROL, M.Z.; SOUZA, M.P.; MATOS, F.J.A. Atividade moluscida de *Pithecelobium multiflorum*. *Rev. Soc. Bras. Med. trop.* v.7, p.11-19, 1973.

SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MORRIL, T.C. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1994. 387p.

SIMÕES, C.M.O.; SHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre: Ed. da UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC, 1999. 821 p.

VALARINI, J.P.; FRIGUETTO, R.T.S.; SPADOTTO, C.A. Potencial da erva medicinal (*Cipopogon citratus*) no controle de fitopatógenos do feijoeiro e plantas daninhas em área irrigada. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.20, p.323, ago. 1995. Suplemento.

VENTURA, J.A. Taxonomia de *Fusarium* e seus segregados I - História, meios e procedimentos de cultivo. **Revisão anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.7, p.271-298, 1999.

VITTI, A.M.S. Avaliação do crescimento e do rendimento e qualidade do óleo essencial de procedências de *Eucalyptus citriodora*. Piracicaba: ESALQ, 1999. 83p. (Dissertação – Mestrado em Ciências Florestais).

ZAMBOLIM, L.; COSTA H.; VALE, F.X.R. Situação atual do controle químico de doenças de hortaliças. In: CONGRESSO IBERO-AMERICANO SOBRE UTILIZAÇÃO DE PLÁSTICO NA AGRICULTURA, 2.; SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE PRODUÇÃO DE PLANTAS MEDICINAIS, AROMÁTICAS E CONDIMENTARES, 1., 2000, SÃO PEDRO, SP. **Trabalhos apresentados e palestras...** Brasília: SOB/FCAV-UNESP, 2000. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.18, p.96-109, 2000. Suplemento.