

Efeito de óleos essenciais de plantas do gênero *Lippia* sobre fungos contaminantes encontrados na micropropagação de plantas¹

Effect of essential oil from genus *Lippia* plants over the control of fungi contaminants on the micro propagation of plants

Olienaide Ribeiro de Oliveira², Daniel Terao³, Ana Cristina Portugal Pinto de Carvalho⁴,
Renato Innecco⁵ e Cynthia Cavalcanti de Albuquerque⁶

Resumo - Os microrganismos contaminantes são considerados um dos principais e mais severos problemas para a micropropagação de plantas. O objetivo deste trabalho foi identificar os principais fungos contaminantes encontrados na micropropagação de plantas, bem como, avaliar o efeito de óleos essenciais de plantas do gênero *Lippia* no controle desses microrganismos. Os contaminantes freqüentemente encontrados no Laboratório de Cultura de Tecido e Genético Vegetal da Embrapa Agroindústria Tropical foram *Aspergillus niger* Van Tieghem, *Penicillium* sp, *Fusarium* sp, e *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp Cubenses (E.f Snith) Snyder e Hans. Avaliou-se o controle do crescimento micelial desses contaminantes utilizando-se óleos essenciais de *Lippia sidoides* Cham. (alecrim pimenta) e de *Lippia gracilis* Schauer (alecrim da chapada) comparando-se com o fungicida Carbendazin. O óleo de *L. sidoides* e o Carbendazin mostraram-se eficientes na inibição do crescimento micelial de todos os fungos avaliados nas concentrações de $3 \times 10^{-1} \mu\text{L mL}^{-1}$ e $3 \times 10^{-2} \mu\text{L mL}^{-1}$, respectivamente. O óleo de *L. gracilis* controlou apenas os fungos *Aspergillus niger* e *Penicillium* sp na concentração de $126 \mu\text{L mL}^{-1}$. Os resultados mostraram possibilidade de utilização de óleos essenciais de *Lippia* como controle alternativo de contaminantes encontrados em Laboratório de Cultura de Tecido de Plantas.

Palavras-chave: Carbendazin. Cultura de tecidos. Controle da contaminação. Óleos essenciais.

Abstract - The contaminants microorganisms are one of the most severe problems for the micro propagation of plants. This work aimed to identify the main fungi contaminants found in the micro propagation of plants and to evaluate the effect of essential oil from genus *Lippia* on the control of these microorganisms. The contaminants often found in the Laboratory of Tissue Culture and Vegetable Genetics of Embrapa Tropical Agroindustry were *Aspergillus nige* Van Tieghem, *Penicillium* sp, *Fusarium* sp, and *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp Cubenses (E.f Snith) Snyder and Hans. The control of the vegetative growth of these contaminants was evaluated using essential oils *L. sidoides* Cham. (alecrim pimenta) and *L. gracilis* Schauer (alecrim da chapada) comparing with the Carbendazin fungicide. The oil *L. sidoides* and the Carbendazin were efficient on the inhibition of the development of all fungi evaluated using the concentrations $3 \times 10^{-1} \mu\text{L mL}^{-1}$ e $3 \times 10^{-2} \mu\text{L mL}^{-1}$, respectively. Oil *L. gracilis* controlled only the fungi *Aspergillus niger* and *Penicillium* sp in the concentration of $126 \mu\text{L mL}^{-1}$. The results showed that we can use the essential oil *Lippia* as an alternative for the control of contaminants in the Laboratory of Tissue Culture of Plants.

Key words: Carbendazin. Tissue culture. Contamination Control. Essential oil.

¹ Recebido para publicação em 19/04/2006; aprovado em 30/10/2007

Parte da monografia do primeiro autor apresentada ao Dep. de Fitotecnia, CCA/UFC, CE

² Eng. Agrônomo, Mestranda em Irrigação e Drenagem, CCA/UFC, CE, naideolivi@gmail.com

³ Eng. Agrônomo, D. Sc., Pesquisador da Embrapa Semi-Árido, Petrolina, PE, danielterao@cpatsa.embrapa.br

⁴ Bióloga, D. Sc., Pesquisadora da Embrapa Agroindustrial Tropical, Fortaleza, CE, Dra. Sara Mesquita, 2270 – Bairro Pici, 60511-110, Fortaleza, Ceará, crisrina@cnpat.embrapa.br (endereço de correspondência)

⁵ Eng. Agrônomo, D. Sc., Prof. do Depto de Fitotecnia, CCA/UFC, CE, innecco@ufc.br

⁶ Bióloga, D. Sc., Profa. da Universidade Estadual do Rio Grande do Norte, Mossoró, RN, cynthiaca@uol.com.br

Introdução

A contaminação microbiana pode causar perdas significativas durante o processo de micropropagação, principalmente quando os explantes são extraídos de plantas mantidas no campo (BARROS; PASQUAL, 1991). O controle microbiano na fase de estabelecimento *in vitro* é importante, pois onde os danos ainda são pequenos, devido ao menor volume de explantes que estão sendo multiplicados, evitam que esses microrganismos passem para as etapas seguintes (MONTARROYOS, 2000).

Dentre os contaminantes mais frequentes no cultivo *in vitro* de plantas estão os fungos filamentosos, as bactérias e as leveduras. Muitos destes não são patogênicos às plantas no campo, entretanto, tornam-se patogênicos na condição *in vitro* durante os processos de micropropagação (LEIFERT et al., 1994). A diferença básica entre esses contaminantes está no fato de que a ocorrência de fungos e leveduras é facilmente percebida no meio de cultura, após poucos dias de cultivo, facilitando a eliminação do material contaminado (LEIFERT; WOODWARD, 1998). As bactérias, por serem muitas vezes de difícil visualização, nem sempre sua presença é evidenciada no início do cultivo, sendo sua disseminação facilitada entre materiais durante as etapas da multiplicação (MONTARROYOS, 2000).

A determinação exata da fonte de contaminação, muitas vezes é difícil, uma vez que os contaminantes podem ser introduzidos em várias etapas no processo de micropropagação. Porém, existem formas de prevenir o aparecimento de contaminações, fazendo-se o controle sistemático de todas as etapas de propagação bem como na área laboratorial (TEIXEIRA; TORRES, 1998). Ácaros, tripes e formigas que penetram nas salas de crescimento, vão para as tampas de recipientes dos cultivos *in vitro*, servindo como vetores para a disseminação de bactérias fastidiosas, vírus, viroides e fungos filamentosos. Infestações por ácaros e tripes têm causado perda total de material vegetal em vários laboratórios (LEIFERT et al., 1991).

As plantas medicinais e aromáticas, com seus princípios ativos antimicrobianos, tornam-se promissoras no controle das doenças de plantas. Vários trabalhos vêm sendo realizados buscando demonstrar o potencial da utilização dessas plantas no controle de fitopatógenos (GADELHA et al., 2003; PASCUAL et al., 2001; ARRAS; USAI, 2001; MONTES-BELMONT; CARVAJAL, 1998; PES-SOA et al., 1996; SINGH et al., 1993).

O taxon genérico *Lippia* (Verbenaceae) inclui aproximadamente 200 espécies de ervas, arbustos e de árvores

de pequeno porte, sendo caracterizado pela presença de óleos essenciais com atividade antimicrobiana, pela presença de composto como timol e carvacrol. A *Lippia sidoides* Cham. (MENDONÇA, 1997) é uma planta que ocorre na região Nordeste do Brasil, principalmente na área abrangida pelos municípios de Mossoró-RN e Tabuleiro do Norte-CE, onde é conhecida popularmente como alecrim, alecrim-pimenta e estrepa-cavalo (LEAL et al., 2003). O óleo essencial obtido de suas folhas é constituído de timol (50 a 60%) e carvacrol (5 a 8%), pode ser extraído das folhas tanto secas como frescas, têm odor forte e sabor aromático picante (CRAVEIRO, 1981). Estudos realizados por Goodmam e Gilman (1978) evidenciaram o efeito bactericida e antimetabólico do timol sobre espécies de *Penicilium*.

O alecrim da chapada, *Lippia gracillis* Schauer é um subarbusto pouco ramificado, com folhas aromáticas e altura variando de 1,2 a 3,0 m. É encontrado na região Nordeste no Município de Piripiri-PI, nas proximidades do Parque Nacional de Sete-Cidades (MATOS et al., 2004; MATOS, 1998). É uma planta rica em óleo essencial cuja composição é constituída pelo timol (10%) e carvacrol (41,7%) (ALBUQUERQUE, 2005; RASSOLI; MIRMOSTAFA, 2003).

Este trabalho teve como objetivo identificar os principais fungos contaminantes encontrados na micropropagação de plantas, bem como avaliar o efeito de óleos essenciais de plantas do gênero *Lippia* no controle desses microrganismos.

Material e Métodos

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, Ceará, entre os meses de janeiro a outubro de 2005. As contaminações fúngicas utilizadas foram oriundas do cultivo *in vitro* de plantas e dentro dos ambientes do Laboratório de Cultura de Tecidos e Genéticos Vegetal da Embrapa Agroindústria Tropical.

Os contaminantes foram isolados em meio de cultura BDA (Batata-Dextrose-Agar) por ser considerado o meio de cultura mais utilizado para cultivo de fungos fitopatogênicos (MENEZES; SILVA-HANLIN, 1997) e incubados em temperatura ambiente (25 °C) na sala de incubação do Laboratório de Fitopatologia. Os contaminantes dos ambientes do laboratório foram obtidos através da distribuição aleatória de placas de Petri contendo meio de

cultura BDA em diferentes locais dentro do laboratório, abertas durante 60 minutos (MICHEREFF et al., 2004). Após uma semana de crescimento, foram feitas várias repicagens até se obter o isolamento do patógeno puro, identificando-se os contaminantes fúngicos mais freqüentemente encontrados nos cultivos *in vitro* de plantas e dentro dos ambientes do laboratório.

Os produtos utilizados para o controle dos fungos contaminantes identificados foram os óleos de *Lippia gracilis*, de *Lippia sidoides* e do fungicida Carbendazin (Derosal SC) nas concentrações 126 $\mu\text{L mL}^{-1}$, $3 \times 10^{-1} \mu\text{L mL}^{-1}$ e $3 \times 10^{-2} \mu\text{L mL}^{-1}$, respectivamente.

Em condições assépticas, os óleos essenciais e o fungicida foram adicionados ao meio de cultura BDA fundente, que em seguida foram vertidos em placas de Petri. Como testemunha, utilizou-se apenas o meio BDA, sem adição de qualquer produto. Após a solidificação do meio, fez-se a transferência de discos de 6 mm de diâmetro contendo estruturas dos fitopatógenos, retirados dos bordos de colônias dos fungos *Fusarium* sp e *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp Cubenses (E.f Snith) Snyd e Hans, após sete dias de cultivo para o centro de cada placa. E para os fungos *Aspergillus niger* Van Tieghem e *Penicillium* sp, adicionou-se 10 mL de água destilada esterilizada sobre a superfície das colônias fúngicas desses fungos, removendo-se levemente o crescimento fúngico com auxílio de uma alça de platina esterilizada. Na suspensão obtida foi filtrada através de gaze em camada dupla esterilizada. Na suspensão obtida foram mergulhados discos de papel de filtro esterilizados, com 6 mm de diâmetro, que foram transferidos para o centro de cada placa. A seguir as placas foram incubadas em temperatura ambiente (25 °C) durante sete dias na sala de incubação em regime de luz intermitente (12/12h) no Laboratório de Fitopatologia. Avaliou-se o crescimento micelial, medindo-se, diariamente, o diâmetro da colônia em dois sentidos diametricamente opostos, durante sete dias, período demandado pelo fungo para ocupar toda a placa Testemunha.

Utilizou-se um delineamento estatístico inteiramente casualizado com 4 tratamentos e 10 repetições por tratamento. Cada repetição era constituída por uma placa de Petri contendo um disco com estruturas dos fungos (*Fusarium* sp e *Fusarium oxysporum*) retirado da colônia, enquanto que *Aspergillus niger* e *Penicillium* sp utilizou-se um disco de papel de filtro esterilizado previamente embebido numa suspensão de esporos para evitar a dispersão de esporos no meio de cultura.

O percentual de redução de crescimento do patógeno foi obtido pela equação (i), segundo Assis et al. (1999) apud Pimenta (2004).

$$\text{RCP}(\%) = \frac{T - \text{CP}}{T} \times 100(i)$$

Em que: RCP = Redução de crescimento do patógeno, CP = Controle positivo e T = Testemunha.

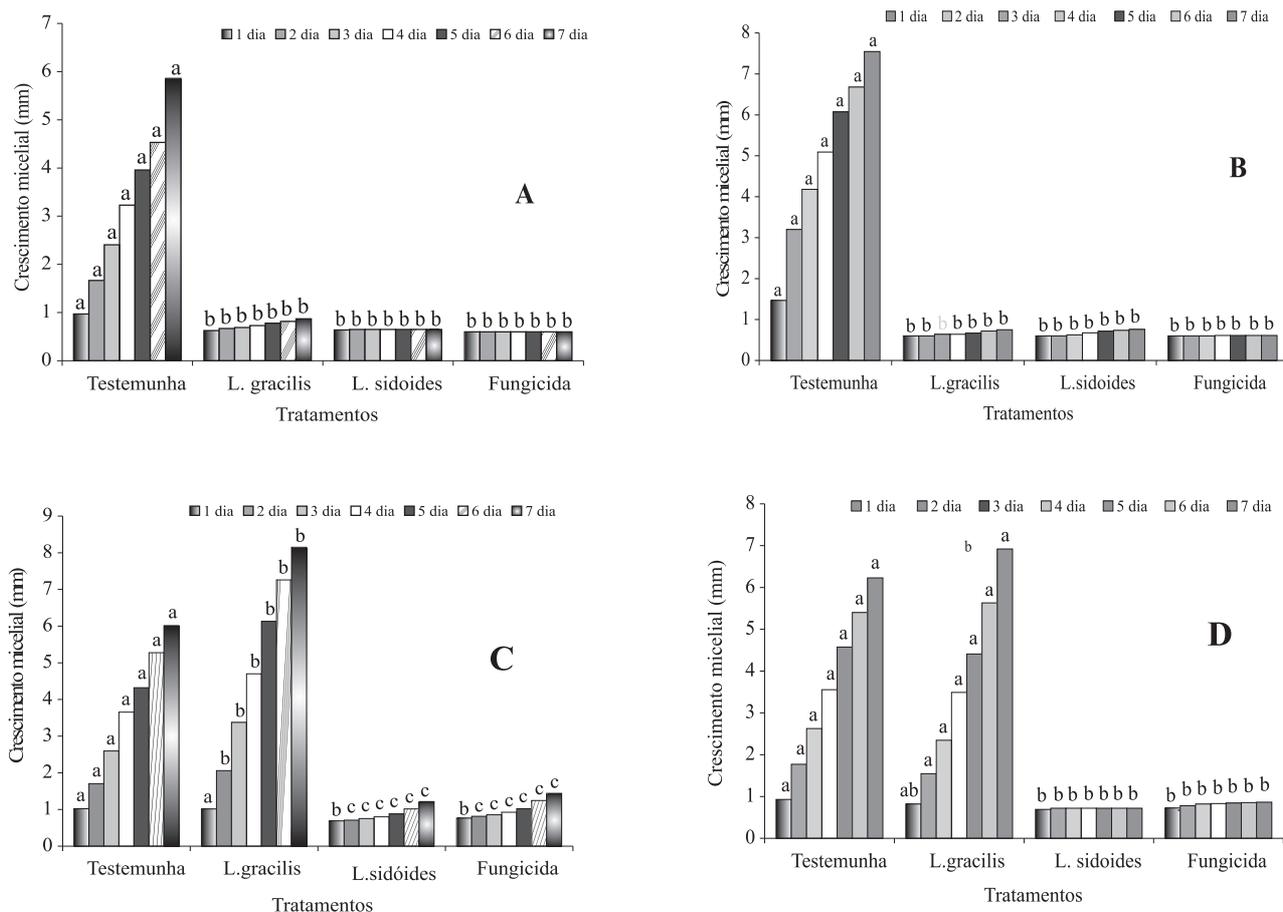
Os dados foram submetidos à análise de variância (ANAVA) e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Os valores de redução de crescimento foram transformados em Log (x + 5), com propósito de normalizar a variação dos tratamentos.

Resultados e Discussões

Os fungos contaminantes *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp, *Fusarium* sp e *Fusarium oxysporum* foram identificados com maior freqüência no Laboratório de Cultura de Tecidos e Genética Vegetal da Embrapa Agroindústria Tropical; aparecem na listagem feita por Montarroyos (2000), que identificou os seguintes gêneros de fungos contaminantes em laboratório desse tipo: *Clamidosporium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Microsporium*, *Rhizopus*, *Candida*, *Curvularia*, *Neurospora*, *Philophora*, *Fusarium* e *Botrytis*.

Observa-se na Figura 1 (A e B), que os óleos essenciais de *L. gracilis* e de *L. sidoides* inibiram o crescimento micelial dos contaminantes, de maneira similar ao fungicida Carbendazin, diferenciando significativamente da Testemunha durante todo o período de avaliação. Essa inibição ocasionada pelos óleos essenciais do gênero *Lippia* é devida aos teores elevados de timol e carvacrol que são responsáveis pela atividade antimicrobiana (MATOS et al., 2004), agindo na redução da germinação conidial, causando a morte subsequente do fungo (DAFERERA et al., 2003; ARRAS; USAI, 2001; LAMBERT et al., 2001; DWIVEDI; SINGH, 1998).

Resultados semelhantes foram encontrados por Albuquerque (2005) no controle de fungos contaminantes, demonstrando a potencialidade do óleo essencial de *L. gracilis* na inibição do crescimento micelial dos fungos contaminantes do ar em helicônias, como sendo *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Paecilomyces aeruginens* e *Curvularia lunata* na dosagem de 420 mL L⁻¹. Estudos realizados por Matos et al. (2004) demonstraram que o óleo essencial de *L. sidoides* apresenta forte atividade microbiana sobre os fungos *Sacharomyces cerevisiae*, *Cryptococcus neoformans* e



Médias seguidas de mesma letra, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

Figura 1 – Efeito dos óleos essenciais de *Lippia sidoides*, *Lippia gracilis* e do fungicida Carbendazim na inibição do crescimento micelial (mm) dos fungos *Aspergillus niger* (A), *Penicilium sp* (B), *Fusarium sp* (C) e *Fusarium oxysporum* (D) durante sete dias de avaliação

Aspergillus flavus. A eficiência do óleo de *L. gracilis* e os resultados de *L. sidoides* na inibição do crescimento dos microrganismos avaliados neste trabalho, estão de acordo com dados de Pascual et al. (2001), ao descobrirem o efeito antimicrobiano dos óleos essenciais das plantas do gênero *Lippia*.

Verifica-se na Figura 1 (C e D), o comportamento dos óleos essenciais de *L. gracilis* e de *L. sidoides* e o Carbendazim no controle dos fungos contaminantes *Fusarium sp* e *Fusarium oxysporum* durante sete dias de avaliação. Observou-se que o óleo essencial de *L. sidoides* mostrou-se eficiente na inibição do crescimento micelial dos contaminantes de maneira similar ao Carbendazim, diferenciando da Testemunha durante o período de avaliação. No entanto, o óleo essencial de *L. gracilis* não inibiu o crescimento micelial desses fungos na dosagem usada; isso, provavelmente, se deve ao

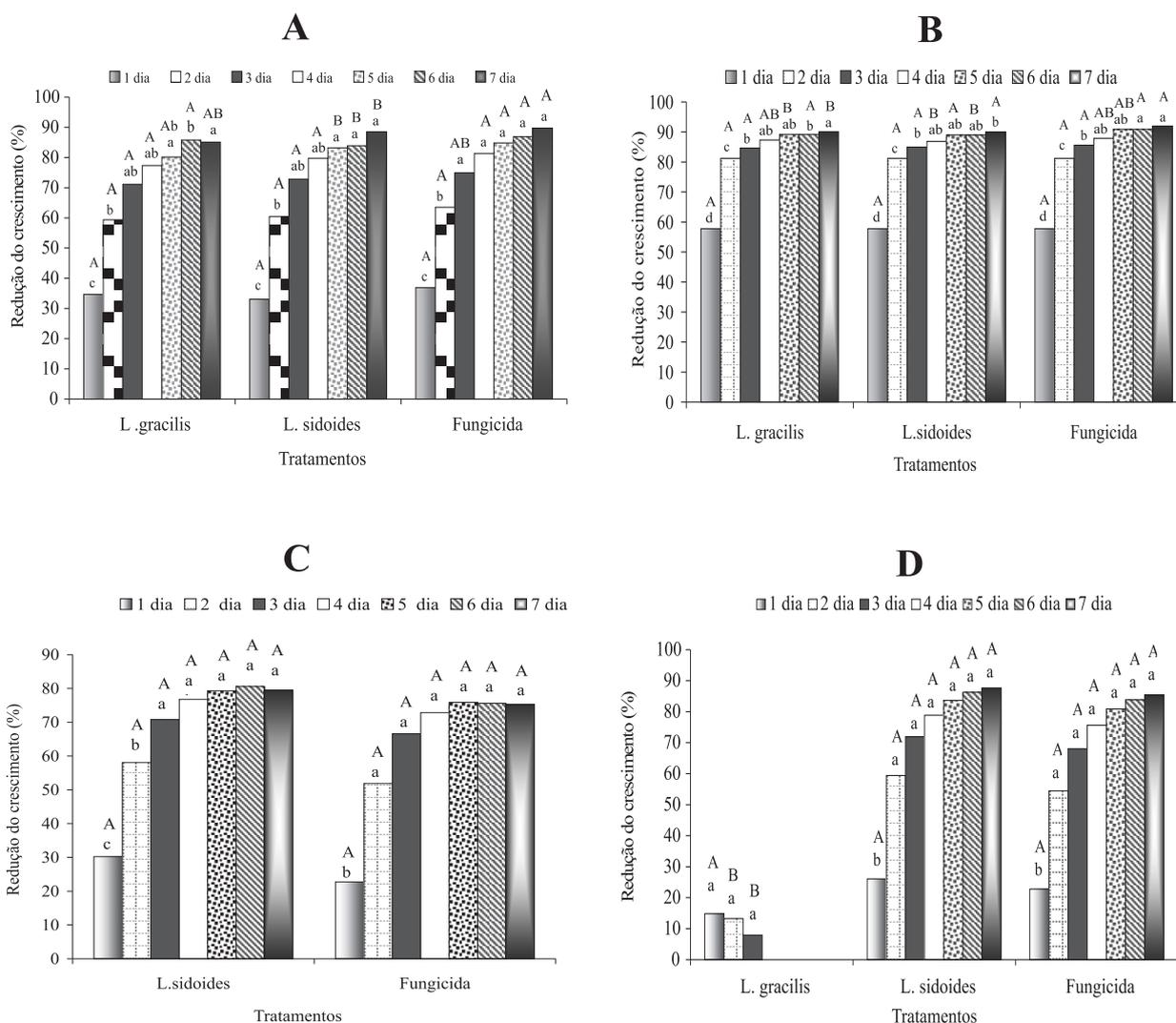
baixo teor de timol dessa espécie (10%), quando comparado ao de *L. sidoides* (50-60%).

Quando se compara o teor de timol (10%) e carvacrol (41,7%) do óleo essencial de *L. gracilis* (ALBUQUERQUE, 2005; RASSOLI; MIRMOSTAFA, 2003), com o de *L. sidoides* que possui de 50 a 60% de timol e 5 a 8% de carvacrol (CRAVEIRO, 1981), pode-se sugerir que óleo *L. gracilis* tem ação específica para determinados gêneros de fungos. Outros resultados no controle de fungos do gênero *Fusarium* foram demonstrados por Singh et al. (1993), em que verificaram o efeito fungicida e fungistático do óleo de menta (*Mentha sp*) sobre 23 espécies de patógeno fungicos, entre eles: *Alternaria sp*, *Curvalaria lunata*, *Fusarium moniliforme*, *F. solani* e *Rhizoctonia bataticola*; os autores usaram concentrações de 500 a 10.000 mg⁻¹ mL do óleo nos respectivos meios de cultura, registrando total inibição do crescimento micelial, a partir de 2.000 mg mL⁻¹.

Pesquisas realizadas por Pessoa et al. (1996) demonstraram a eficiência de *L. sidoides* por meio da adição de frações da tintura ou do óleo essencial no controle *in vitro* dos fungos oriundos do campo e do armazenamento (*Macrophomina phaseolina*, *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Rhizopus* sp), obtendo significativa inibição desses patógenos, na concentração de 10 mL por 100 mL (10%) quando comparado com a Testemunha que não tinha adição de frações da tintura ou do óleo. Gadelha et al. (2003) constataram a eficiência do óleo de *L. sidoides* no controle de *Fusarium* sp durante o trata-

mento pós-colheita do pedúnculo de melão (*Cucumis melo* L.) cv Orange Fleshh como preventivo nas concentrações de 20 mL L⁻¹ e 40 mL L⁻¹ como curativo.

Na Figura 2 (A e B), observou-se com relação aos produtos testados, que os fungos *Aspergillus niger* e *Penicillium* sp apresentaram controle de 80% a partir do segundo dia. Essa taxa tornou-se crescente, e ao sétimo dia alcançou o patamar máximo de 90%. Resultados semelhantes foram demonstrados em estudos feitos por Arras e Usai (2001) e Montes-Belmont e Carvajal (1998) com plantas dos gêneros *Thymus* e o *Origanum*, em que o timol e o



Médias seguidas de mesma letra, maiúscula entre categorias e minúscula dentro da mesma categoria, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

Figura 2 - Efeito dos óleos essenciais de *Lippia sidoides*, *Lippia gracilis* e do fungicida Carbendazin no percentual de redução do crescimento micelial (mm) dos fungos *Aspergillus niger* (A), *Penicillium* sp (B), *Fusarium* sp (C) e *Fusarium oxysporum* (D) durante sete dias de avaliação

carvacrol provocaram a inibição do crescimento micelial dos fungos: *Aspergillus flavus*, *Penicillium digitalicum*, *Penicillium italicum*, *Botrytis cinerea* e *Alternaria citri*, todos parasitas de pós-colheita de sementes de milho. Esses autores verificaram a eficiência no controle do fungo *Aspergillus flavus* na concentração de 43,7% de timol e para o *Penicillium digitalicum* 75 ppm do carvanol.

Constatou-se que o óleo de *L. sidoides* e o Carbendazim reduziram significativamente e de maneira progressiva, o desenvolvimento dos fungos *Fusarium* sp e *F. oxysporum* em 80% e 90% após sete dias, respectivamente (Figura 2 C e D). No tratamento com óleo de *L. gracilis*, mesmo sendo considerado de amplo espectro, não ocorreu inibição do crescimento micelial de *Fusarium* sp durante os sete dias de avaliação, enquanto o *Fusarium oxysporum* foi controlado nos três primeiros dias de avaliação.

Conclusões

O óleo essencial de *L. sidoides* e o fungicida Carbendazim apresentaram controle na inibição do crescimento micelial para todos os fungos avaliados *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp, *Fusarium* sp, e *F. oxysporum*, enquanto o óleo de *L. gracilis* inibiu apenas *A. niger* e *Penicillium* sp. O óleo essencial de *L. sidoides* e carbendazim obtiveram um percentual de controle próximo de 90% para todos os fungos avaliados, enquanto o óleo de *L. gracilis* controlou neste mesmo percentual apenas o *A. niger* e *Penicillium* sp; e de acordo com os resultados obtidos, podemos concluir que os óleos essenciais das plantas do gênero *Lippia* podem ser uma alternativa para o controle de contaminantes em Laboratórios de Cultura de Tecidos de Plantas, devido, provavelmente, aos seus princípios ativos compostos de timol e carvacrol, com predominância para *L. sidoides*.

Referências

- ARRAS, G.; USAI, M. Fungitoxic activity of 12 oils against four postharvest citrus pathogens: Chemical analysis of Thymus capitatus oil and its effect in subatmospheric pressure conditions. **Journal of Food Protection**, n. 64, v. 07, p. 1025- 1029, 2001.
- ALBUQUERQUE, C. C. **Ação do óleo essencial *L. gracilis* Schauer sobre fungos contaminantes do ar e bactérias endofíticas cultivadas de helicônias *in vitro***. 2005. 85 f. Tese (Doutorado em Botânica)-Universidade Federal Rural de Pernambuco, Pernambuco.
- BARROS, I. de; PASQUAL, M. Contaminação fúngica, bacteriana e oxidação *in vitro* de explantas de *Cofea arabica* L. cv. Catuai LCH-2077-2-5-44. **Ciência Prática**, n. 1, p. 145- 53,1991.
- CRAVEIRO, A. A. **Óleos essenciais de plantas do Nordeste**. Fortaleza: Edições UFC, 1981. 209 p.
- DAFERERA, D. J.; ZIOGAS, B. N.; POLISSIOU, M. G. The effectiveness of plant essential oils on the growth of Botrytis cinerea, *Fusarium* sp. and Clavibacter michiganensis subsp. Michiganensis. **Crop Protection**, v. 22, n. 01, p. 39- 44, 2003.
- DWIVEDI, S. K.; SINGH, K. P. Fungitoxicity of some higher plant products against Macrophomina phaseolina (Tassi) **Goid. Flavour and Fragrance Journal**, v. 13, n. 06, p. 397- 399, 1998.
- GADELHA, J. C. et al. Defensivos naturais no tratamento pós-colheita do pendúculo de melão. **Revista Ciência Agronômica**, v. 34, n. 01, p. 5-10, 2003.
- GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1978. 2 v.
- LAMBERT, R. J. W. et al. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, p. 453- 462, 2001.
- LEIFERT, C et al. Elimination of *Lactobacillus pantaram*, *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus saprophyticus* and *Pseudomonas paucimobilis* from micropropagated *Hemerocallis*, *Choisa* and *Delphinium* cultures using antibiotics. **Journal Applied. Bacteriol.** v. 07, p. 307- 30, 1991.
- LEIFERT, C.; MORAIS, C.E.; WAITES, W.M. Ecology of microbial saprophytes and pathogens in tissue culture and field grown plants: reason for contamination problems *in vitro*. **Critical Reviews in plant Sciences**, v. 13, p. 139-83, 1994.
- LEIFERT, C.; WOODWARD, S. Laboratory contamination management: the requirement for microbiological quality assurance. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v. 52, n. 01/ 02, p. 83- 88, 1998.
- LEAL, L. K. A. M. et al. Análise de timol por CLAE na tintura de *Lippia sidoides* Cham. (alecrim-pimenta) produzida em diferentes estágios de desenvolvimento da planta. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, p. 09-11, 2003.
- MATOS, F. J. A. et al. **Constituintes químicos ativos e propriedades biológicas de plantas medicinais brasileiras**. 2. ed. Fortaleza: Ed. UFC, 2004. 445 p
- MATOS, F. J. A. **Farmácias vivas sistemas de utilização de plantas medicinais projetadas para pequenas propriedades**. 3. ed. Fortaleza: Ed. UFC, 1998. 220 p.
- MENDONÇA, C.da S. **Efeito do ácido indol butírico no enraizamento de estacas de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.)**. 1997, 43 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)-Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.
- MENEZES, M.; SILVA-HANLIN, D. M. W. **Guia prático para fungos fitopatogênicos**. Recife: UFRPE, Imprensa Universitária, 1997. 106 p.

- MONTARROYOS, A. V. V. **Contaminação *in vitro* Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais**. Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária (IPA), 2000. p. 5-10.
- MONTES-BELMONT, R.; CARVAJAL, M. Control of *Aspergillus flavus* in maize with plant essential oils and their components. **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 05, p. 616-619, 1998.
- MCHEREFF, S. J. et al. Ocorrência e controle de fungos contaminantes em câmaras de frigoconservação de frutos na cidade de Recife. **Summa Phytopathol**, v. 30, n. 02, p.198- 203, 2004.
- PASCUAL, M. E. et al. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, n. 03, p. 201-214, 2001.
- PESSOA, M. N. G.; OLIVEIRA, J. C. M.; INNECCO, R. Efeito da tintura de alecrim pimenta contra fungo fitopatogênicos *in vitro*. **Revista Fitopatologia Brasileira**, v. 21, p. 404, 1996.
- PIMENTA, R. S. **Utilização de Leveduras predadoras como agentes de controle biológico de fungos filamentosos causadores de doenças pós-colheita**. 2004, 105 f. Tese (Doutorado em Microbiologia)- Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- RASSOLI, I.; MIRMOSTAFA, S. A. Bacterial susceptibility to and chemical composition of essential oils from *Thymus kotschyianus* and *Thymus persicus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 2200–2205, 2003.
- SINGH, H. N. P.; PRASAD, M. M.; SINHA, K. K. Efficacy of leaf extracts of some medicinal plants against disease development in banana. **Letters in Applied Microbiology**, v. 17, n. 06, p. 269-271, 199.
- TEXEIRA, S. L.; TORRES, A. C. Organização do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas. In: TORES, A. C.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação de plantas**. Brasília: Embrapa - SPI, CNPH, v. 1, 1998. p. 71-72.