

Efeito do óleo essencial de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC) e do emulsificante Tween® 80 sobre o crescimento micelial de *Alternaria alternata* (Fungi: Hyphomycetes)

Fabiane Reis NASCIMENTO¹, Maria Graças CARDOSO², Paulo Estevão SOUZA², Rafaela Karin LIMA², Ana Paula Soares Pinto SALGADO², Luiz Gustavo Lima GUIMARÃES²

RESUMO

Este trabalho objetivou avaliar o efeito do óleo essencial de folhas de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC), sobre o crescimento micelial de *Alternaria alternata* e a análise da influência da concentração do emulsificante Tween® 80 no controle deste fitopatógeno. O óleo essencial foi obtido pela técnica “arraste a vapor d’água”, utilizando-se aparelho de Clevenger modificado, e posteriormente submetido, à análise por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrômetro de massas CG-EM a CG. Para os ensaios biológicos, o método foi o bioanalítico *in vitro* observando-se o crescimento ou inibição do micélio de *A. alternata* no meio de cultura BDA na presença de diferentes concentrações do óleo essencial (0, 100, 250, 500 e 1000 mgL⁻¹) sob diferentes concentrações de Tween® 80. Adotou-se esquema fatorial com quatro repetições, em delineamento inteiramente casualizado (DIC). Observou-se que o óleo essencial de pimenta longa apresentou inibição sobre o crescimento micelial do fungo *A. alternata* em todas as concentrações analisadas, sendo que na concentração de 1000 mgL⁻¹ esta inibição foi de 100% , e a porcentagem de emulsificante (Tween® 80), influenciou na atividade fungitóxica das concentrações de 250 mgL⁻¹ e 500 mgL⁻¹ do óleo essencial.

PALAVRAS-CHAVE: Óleo essencial, safrol, *Alternaria alternata*

The effect of Long-pepper essential oil (*Piper hispidinervum* C. DC.) and of Tween® 80 emulsifier on the mycelial growth of *Alternaria alternata* (Fungi: Hyphomycetes).

ABSTRACT

The object of this work was to evaluate the effect of essential oils from Long-pepper leaves *Piper hispidinervum* on the mycelial growth of *Alternaria alternata* and to analyze the influence of emulsifier Tween® 80 concentration in the control of this phytopathogen. The essential oil was obtained by steam stream distillation, using a modified Clevenger apparatus, and the chemical composition was analyzed by gas chromatography coupled to mass spectroscopy GC-MS and GC. For biological tests, the bioanalytical *in vitro* method was used, observing the growth or inhibition of such phytopathogen in BDA culture media, in the presence of different essential oil concentrations (0, 100, 250, 500, e 1000 mgL⁻¹) under different Tween® 80 concentrations. Factorial scheme with four repetitions, in entirely randomized outline was adopted. The essential oil of Long-pepper inhibited the micelial growth of the *A. alternata* fungus at all of the concentrations tested. A 100% inhibition at the 1000 mgL⁻¹ concentration was observed, and the percentage of emulsifier (Tween® 80) influenced the fungitoxic activity at the 250 mgL⁻¹ and 500 mgL⁻¹ concentrations of the essential oil.

KEY WORDS: Essential oil, safrole, *Alternaria alternata*

¹ Universidade do Vale do Rio Verde/Unincor, mcardoso@ufla.br

² Universidade Federal de Lavras/UFLA, mcardoso@ufla.br, rafakaran@yahoo.com.br, apsalgado@yahoo.com.br, luizufop@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

As espécies do gênero *Piper* são amplamente aplicadas na medicina popular em função das propriedades microbianas exibidas por seus constituintes. Na Amazônia, foi identificada a espécie *Piper hispidinervum* C. DC., arbusto encontrado em áreas antropizadas no estado do Acre, vulgarmente conhecida como pimenta longa, com óleo essencial rico em safrol, a qual vem se tornando importante alternativa econômica para os agricultores tradicionais e famílias extrativistas da Amazônia (Souza *et al.*, 2001; Wadt *et al.*, 2004). Em razão de vários fatores, vem se verificando uma crescente procura por defensivos alternativos para o efetivo controle de pragas, oferecendo maior segurança, seletividade, biodegradabilidade, viabilidade econômica e aplicabilidade em programas integrados de controle de pragas e baixo impacto ambiental (Junior, 2003). Técnicas que consistem no emprego de extratos vegetais, aminoácidos, microorganismos e óleos essenciais, se enquadram em estratégias de controle biológico de patógenos (Bastos e Alburquerque, 2004).

As doenças causadas pelo fungo *Alternaria* sp. estão entre as doenças de plantas mais comuns no mundo, que afetam as folhas, os caules, as flores e os frutos das plantas. Um grande número de espécies de *Alternaria*, causam manchas foliares em diversas plantas cultivadas e não cultivadas (Mello *et al.*, 2001).

O emulsificante Tween® 80 (monoleato de sorbitano polioxietileno), um surfactante não-iônico, tem sido muito empregado como agente dispersante na preparação das soluções, produzindo um procedimento mais confiável na preparação do inóculo. Entretanto, os surfactantes podem interagir com organismos e drogas afetando a atividade *in vitro* de agentes antimicrobianos. Nenhuma quantidade padrão desse agente tem sido empregada na maioria das publicações até agora. De acordo com Gomez-Lopez *et al.* (2005) o surfactante poderia modificar a solubilidade do antifúngico, desenvolvida em um meio e auxiliar na precipitação do agente, levando ao aumento das CIMs. Chagas *et al.* (2002) observaram que óleos essenciais foram potencializados quando transformados em concentrados emulsionáveis, principalmente quando avaliados contra larvas de carrapato.

Portanto, este trabalho objetivou avaliar o efeito do óleo essencial de folhas de pimenta longa *P. hispidinervum*, seu efeito sobre o crescimento micelial de *A. alternata* e a análise da influência da concentração do emulsificante Tween® 80 no controle deste fitopatógeno.

MATERIAL E MÉTODOS

As folhas de pimenta longa foram coletadas em abril de 2006 de plantas cultivadas no Horto de Plantas Medicinais da Universidade Federal de Lavras (UFLA), situada na cidade

de Lavras - MG, localizada a uma latitude 21° 14' 43 sul e a uma longitude 44° 59' 59 oeste, estando a uma altitude de 919 metros. O material vegetal foi identificado pelo Prof. Manoel Losada Gavilanes do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, e sua exsicata encontra-se depositada no Herbário da UFLA (registro 23.013).

A extração do óleo essencial das folhas de pimenta longa foi realizada por meio da técnica de "arraste a vapor", utilizando-se aparelho de Clevenger modificado. Coletou-se o hidrolato, que em seguida foi centrifugado em centrífuga de cruzeta horizontal a 965,36 x G por 5 minutos. Retirou-se o óleo essencial com auxílio de uma micropipeta, acondicionando em um frasco de vidro âmbar envolto com papel alumínio, mantendo-o sobre refrigeração (Castro *et al.*, 2006).

Posteriormente o mesmo foi submetido à cromatografia em fase gasosa acoplada ao espectrômetro de massas, em equipamento Shimadzu, modelo CG-17A, com detector seletivo de massa, modelo QP 5000. O equipamento foi operado nas seguintes condições: coluna cromatográfica utilizada foi do tipo capilar de sílica fundida com fase ligada DB5, de 30 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno, utilizando hélio como gás carreador (1 mL/min). As temperaturas foram de 220 °C no injetor e 240°C no detector. A temperatura do forno foi programada de 40 a 240 °C, com acréscimo de 3 °C a cada minuto. Identificaram-se os compostos por comparação dos espectros de massas obtidos, com o banco de dados da biblioteca Wiley 229 e o índice de Kovats calculado foi comparado com o tabelado (Adams, 1995). A quantificação dos constituintes foi realizada utilizando um cromatógrafo com fase gasosa Shimadzu, modelo 17A, equipado com detector de ionização de chama de hidrogênio e coluna capilar DB5, de 30 cm de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno. O gás de arraste utilizado foi o nitrogênio (2,2 mL/min); a taxa split 1:20 e volume injetado de 1µL. A temperatura inicial da coluna foi de 45 até 240 °C sendo programada para ter acréscimos de 3 °C a cada min, até atingir a temperatura máxima de 240 °C. As temperaturas do injetor e do detector foram fixadas em 220 e 240 °C, respectivamente, com a pressão da coluna de 115 KPa. O óleo essencial foi injetado três vezes, obtendo-se a concentração média e o desvio padrão para cada constituinte, sendo a quantificação obtida por meio da normalização de área (%).

A espécie fúngica (Linhagem CML 1347) foi obtida da coleção Micologia de Lavras identificada pela morfologia, procedente de sementes de sorgo de Lavras/Minas Gerais, mantido nesta. Foi cultivada em meio de cultura BDA (batata, dextrose, ágar), previamente fundido, colocados em placa de Petri de 9 cm e incubados em câmara de germinação a uma temperatura de 25°C, sob fotoperíodo de 12 horas luz e 12 horas escuro.

As concentrações de óleo essencial testadas foram (0, 100, 250, 500 e 1000 mgL⁻¹). Cada concentração do óleo essencial foi também avaliada sob diversas concentrações do emulsificante Tween® 80 (0, 25%, 50% e 75%). As soluções do óleo essencial assim formadas, foram solubilizadas em 2,5mL de éter etílico (solvente).

Prepararam-se as seguintes testemunhas, uma absoluta (somente com o meio de cultura BDA) e outra relativa (meio de cultura BDA com o solvente). O método utilizado foi o bioanalítico *in vitro* observando-se o crescimento ou inibição do micélio (Guimarães, 2007).

Em uma capela de fluxo laminar, concentrações do óleo, previamente emulsificadas nas diferentes concentrações de Tween® 80 e solubilizadas em solvente ideal foram adicionadas em meios de cultura (BDA), fundente, usando método de diluição em ágar e vertidos em placas de Petri de 9 cm previamente esterilizadas. Após, foram depositados discos miceliais invertidos de 9 mm de diâmetro nos centros das placas, retirados das culturas padrão dos fungos em estudo. Paralelamente foram feitas placas testemunhas (absoluta e relativa). As placas foram criteriosamente lacradas, identificadas e incubadas em câmara de germinação sob fotoperíodo de 12 horas luz e 12 horas escuro à 25°C por 8 dias. Foi observada a atividade fungicida do óleo essencial por meio de medições ortogonais do diâmetro das colônias em dias alternados, sendo que cada medição correspondeu à média de duas medidas diametralmente opostas da colônia fúngica, tendo como referência as placas testemunhas (absoluta e relativa) (Salgado *et al.*, 2003).

Adotou-se o esquema fatorial com quatro repetições, em delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC) realizando-se teste de diferenciação de médias de Tukey. Os tratamentos foram dispostos em esquema fatorial combinando-se quatro concentrações de Tween® 80 (0, 25%, 50% e 75%) com cada concentração do óleo essencial de pimenta longa *P. hispidinervum* (0, 100 mgL⁻¹, 250 mgL⁻¹, 500 mgL⁻¹ e 1000 mgL⁻¹). O índice de crescimento micelial (ICM), foi calculado pela fórmula modificada de Nakagava Maguire adaptada por Oliveira (1992).

$$ICM = \frac{C_1}{N_1} + \frac{C_2}{N_2} + \frac{C_n}{N_n}$$

C₁, C₂ e C_n - crescimento micelial das colônias na primeira, segunda e última avaliação.

N₁, N₂ e N_n - número de dias.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Constatou-se que o óleo essencial de pimenta longa apresentou 82,5 % de safrol e em menores concentrações os monoterpenos α-pineno (0,68%), δ-3-careno (1,31%) e α-terpinoleno (13,38%). Miranda (2002) trabalhando com o óleo essencial de pimenta longa coletadas na região amazônica encontrou um teor de safrol superior a 92%, Fazolin *et al.* (2007) afirmaram que este óleo essencial extraído de plantas desta região apresentam teores de safrol superiores a 90%. O menor teor de safrol encontrado no óleo essencial estudado pode ser decorrente da variação de fatores como sazonalidade, desenvolvimento, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta e fontes de nutrientes (Neto e Lopes, 2007).

Os dados descritos na Tabela 1 mostram a influência da concentração do emulsificante Tween® 80 nos ensaios biológicos. Observou-se que, na concentração de 100 mgL⁻¹ não houve nenhuma diferença significativa no efeito do mesmo sobre o crescimento micelial, porém nas concentrações de 250 e 500 mgL⁻¹ de óleo essencial foram observadas diferenças significativas dependendo das concentrações do emulsificante.

Os resultados médios obtidos no Índice de Crescimento Micelial (ICM) das colônias de *A. alternata* submetidas às concentrações do óleo essencial de pimenta longa encontram-se na Tabela 1.

Houve diferença significativa a 5% de probabilidade sobre as médias do ICM a partir da concentração de 100 mgL⁻¹, demonstrando redução no crescimento micelial nas concentrações 100, 250, 500 e 1000 mgL⁻¹. A inibição completa ocorreu na concentração de 1000 mgL⁻¹, sendo o

Tabela 1 - Resultados médios do índice de crescimento micelial (ICM) de *A. alternata* submetido a cinco concentrações do óleo essencial de pimenta longa e a quatro concentrações do emulsificante Tween® 80.

Concentração do óleo essencial (mgL ⁻¹)	% emulsificante (ICM)			
	0%	25%	50%	75%
0 mgL ⁻¹	6,78 e A	6,80 e A	6,75 e A	6,79 e A
100 mgL ⁻¹	5,90 d A	5,64 d A	5,75 d A	5,51 d A
250 mgL ⁻¹	5,11 c B	4,63 c A	4,48 c A	4,24 c A
500 mgL ⁻¹	3,34 b B	3,13 b B	2,99 b B	2,03 b A
1000 mgL ⁻¹	0 a	0 a	0 a	0 a

Médias seguidas por uma mesma letra não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. Letras minúsculas compara-se na coluna e letras maiúsculas compara-se na linha.

ICM da mesma igual a 0. Este comportamento foi semelhante dentro de cada porcentagem de emulsificante utilizada, quanto comparadas com a testemunha relativa, ou seja, nessas concentrações nenhum efeito inibitório no crescimento foi mostrado pelo emulsificante.

Muitos estudos têm demonstrado a atividade de diversos óleos essenciais em bactérias e fungos fitopatogênicos. Fiori *et al.* (2000) demonstraram o efeito fungitóxico do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* sobre o crescimento micelial de *Didymella bryoniae*. Observaram que a concentração de 1% do óleo no meio de cultura foi capaz de inibir totalmente o crescimento desse microrganismo. Fandohan *et al.* (2004) avaliaram a atividade antifúngica “*in vitro*” e “*in vivo*” deste óleo essencial sobre *Fusarium verticillioides*, e constataram uma concentração mínima inibitória para o crescimento micelial do fungo de 1,3 µL/mL. Para o teste “*in vivo*”, após 21 dias, observaram uma redução significativa da incidência do fungo (<20%) na concentração de 4,0 µL/mL, ocorrendo completa inibição na concentração de 8,0 µL/mL.

A atividade fungitóxica de óleos essenciais extraídos de diversas plantas pertencentes ao gênero *Piper* têm sido relatada em diversos trabalhos, como os de Bastos (1997) e Bastos e Albuquerque (2004) que demonstram a ação inibitória do óleo essencial de *Piper aduncum* L. contra *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer juntamente com a inibição *in vitro* do crescimento micelial de vários outros fitopatogênicos. Neste mesmo ano, Hanada *et al.* (2004) demonstraram a inibição parcial da germinação de conídios de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet com o óleo essencial de *P. hispidinervum*. Estudos de Navickiene *et al.* (2006) demonstram a atividade fungitóxica dos óleos essenciais extraídos das folhas, caule e frutos das seguintes espécies de pimentas *Piper aduncum*, *Piper arboreum* e *Piper tuberculatum*; sobre *Cladosporium sphaerospermum* e *Cladosporium cladosporioides*.

Em relação à influência do emulsificante Tween® 80 no efeito sobre o crescimento micelial de *A. alternata* observou-se que houve uma diferença significativa sobre o crescimento micelial nas concentrações de 250 mgL⁻¹ e 500mgL⁻¹ do óleo essencial, confirmando os dados de Gomez-Lopez *et al.* (2005) que empregando o emulsificante Tween® 80 como agente dispersante na preparação das soluções, observaram a interação deste emulsificante com os microrganismos e as drogas em estudo, ocasionando uma diminuição da atividade *in vitro* das mesmas. Estes avaliaram também o efeito de diferentes concentrações de Tween® no ICM de compostos antifúngicos, encontrando um aumento dos ICMs de acordo o aumento da concentração de Tween® utilizada na preparação do inóculo.

Altas concentrações de Tween podem reduzir a atividade fungitóxica pela formação de possíveis micelas, as quais podem

impedir o contato das substâncias constituintes do óleo essencial com o microrganismo (Takarada *et al.*, 2004).

A estimativa das atividades antibacterianas de muitos compostos derivados das plantas é dificultada devido a baixa solubilidade destes em água. Solubilizantes, como os surfactantes e solventes, têm sido usados para resolver esse problema, mas pode ser difícil distinguir a contribuição na atividade antimicrobiana do solubilizante dos compostos sob investigação (Inoue *et al.*, 2005).

Segundo Hammer *et al.*, (1999), ao utilizar um agente emulsificante deve-se levar em consideração as possíveis interações entre este agente e os componentes do óleo essencial, além das possíveis atividades microbianas que podem ser apresentadas pelo mesmo. Para eles, estes efeitos podem variar de acordo com a relação óleo essencial e emulsificante, o que torna imprescindível a utilização adequada desta relação.

Hood *et al.* (2003) estudando o efeito do Tween® 80 utilizado para difundir o óleo essencial no meio de cultura, sobre a atividade bactericida relata a influência na susceptibilidade do microrganismo estudado ao óleo essencial de acordo com a concentração do emulsificante utilizada. Segundo estes, há muitas hipóteses propostas para explicar esta influência, destacando-se a alteração da permeabilidade da membrana celular do microrganismo causada pelo Tween® 80, atuando antagonisticamente contra os componentes do óleo essencial.

Além disso, existem muitos métodos diferentes usados na investigação da atividade antimicrobiana e os resultados obtidos por esses métodos não podem ser diretamente comparáveis. De acordo com Nascimento *et al.* (2007) é necessária a padronização de diversos fatores, como o tempo de exposição do microrganismo ao óleo, a utilização de controles positivos e negativos, o uso da quantidade de emulsificador, a composição do óleo e a descrição precisa das condições em que foi obtida, para que se possa determinar a verdadeira atividade biológica dos óleos essenciais estudados e também realizar estudos comparativos diretos entre eles.

CONCLUSÕES

O óleo essencial de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC.) apresentou atividade fungitóxica sobre o crescimento micelial do fitopatógeno *Alternaria alternata* em todas as concentrações analisadas, e o emulsificante Tween® 80 influenciou na atividade fungitóxica das concentrações de 250 mgL⁻¹ e 500 mgL⁻¹ do óleo essencial estudado.

AGRADECIMENTOS

A UNINCOR (Universidade Vale do Rio Verde – Três Corações, MG), a UFLA (Universidade Federal de Lavras –

Lavras, MG) pela realização deste trabalho, a FAPEMIG e ao CNPq pelas bolsas e auxílios concedidos.

BIBLIOGRAFIA CITADA

- Adams, R.P. 1995. *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy*. Allured Publ. Corp. Carol Stream, IL. 469pp.
- Bastos, C.N. 1997. Efeito do óleo de *Piper aduncum* sobre *Crinipellis pernicioso* e outros fungos fitopatogênicos. *Fitopatologia Brasileira*, 22(3): 441-443.
- Bastos, C.N.; Albuquerque, P.S.B. 2004. Efeito do óleo de *Piper aduncum* no controle em pós-colheita de *Colletotricum musae* em banana. *Fitopatologia Brasileira*, 29(5): 555-557.
- Castro, D.P.; Cardoso, M.G.; Moraes, J.C.; Santos, N.M.; Baliza, D.P. 2006. Não preferência de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) por óleos essenciais de *Achillea millefolium* L. e *Thymus vulgaris* L. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, 8(4): 27-32.
- Chagas, A.C.S.; Passos, W.M.; Prates, H.T.; Leite, R.C.; Furlong, J.; Fortes, I.C.P. 2002. Efeito acaricida de óleos essenciais e concentrados emulsionáveis de *Eucalyptus* spp em *Boophilus microplus*. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 39(5): 247-253.
- Fandohan, P.; Gbenou, J.D.; Gnonlonfin, B.; Hell, K.; Marasas, W.F.O.; Wingfield, M.J. 2004. Effect of essential oils on the growth of *Fusarium verticillioides* and Fumonisin contamination in corn. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(22): 6824-6829.
- Fazolin, M.; Estrela, J.L.V.; Fazolin, M.; Catani, V.; Alécio, M.R.; Lima, M.S. 2007. Propriedade inseticida dos óleos essenciais de *Piper hispidinervum* C.DC.; *Piper aduncum* L. e *Tanaecium nocturnum* (Barb. Rodr.) Bur. & K.Shum sobre *Tenebrio molitor* L. 1758. *Ciência e Agrotecnologia*, 31(1): 113-120.
- Fiori, A.C.G.; Schwan-Estrada, K.R.F.; Stangarlin, J.R.; Vida, J.B.; Scapim, C.A.; Cruz, M.E.S.; Pascholati, S.F. 2000. Antifungal activity of leaf extracts and essential oils of some medicinal plants against *Didymella bryoniae*. *Journal of Phytopathology*, 148(7): 483-487.
- Gomez-Lopez, A.; Aberkane, A.; Petrikkou, E.; Mellado, E.; Rodriguez-Tudela, J.L.; Cuenca-Estrella, M. 2005. Analysis of the influence of tween concentration, inoculum size, assay medium, and reading time on susceptibility testing of *Aspergillus* spp. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(3): 1251-1255.
- Guimarães, L.G.L. 2007. *Estudo da estabilidade e do efeito fungitóxico do óleo essencial de capim-limão (Cymbopogon citratus (D.C.) Stapf)*. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais. 72pp.
- Hammer, K.A.; Carson, C.F.; Riley, T.V. 1999. Antimicrobial activity of essential oils and others plants extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 86: 985-990.
- Hanada, R.E.; Gasparotto, L.; Pereira, J.C.R. 2004. Eficiência de desinfestantes na erradicação de confídios de *Mycosphaerella fijiensis* aderidos à superfície de bananas. *Fitopatologia Brasileira*, 29(1): 94-96.
- Hood, J.R.; Wilkinson, J.M.; Cavanagh, H.M.A. 2003. Evaluation of common antibacterial screening methods utilized in essential oil research. *Journal of Essential Oil Research*, 15: 428-433.
- Inoue, Y.; Hada, T.; Shiraishi, A.; Hirose, K.; Hamashima, H.; Kobayashi, S. 2005. Biphasic effects of geranylgeraniol, teprenone, and phytol on the growth of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(5): 1770-1774.
- Júnior, C.V. 2003. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. *Química Nova*, 26(3): 390-400.
- Mello, S.C.M.; Ribeiro, Z.M.A.; Sousa, G.R.; Tigano, M.; Nachtigal, G.F.; Fontes, E. M.G. 2001. Padrões isoenzimáticos e morfologia de isolados de *Alternaria* spp. patogênicos a *Senna obtusifolia*. *Fitopatologia Brasileira*, 26(3): 667-669.
- Miranda, E.M. 2002. Caracterização e avaliação produtiva de uma população nativa de Pimenta Longa (*Piper hispidinervum*) no Seringal Cachoeira, AC, Brasil. *Acta Amazônica*, 32(1): 9-20.
- Nascimento, P.F.C.; Nascimento, A.C.; Rodrigues, C.S.; Antonioli, A.R.; Santos, P.O.; Barbosa Júnior, A.M.; Trindade, R.C. 2007. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 17: 108-113.
- Navickiene, H.M.D.; Morandim, A.A.; Marques, M.O.M.; Young, M.C.M.; Kato, M.J. 2006. Composition and antifungal activity of essential oils from *Piper aduncum*, *Piper arboreum* e *Piper tuberculatum*. *Química Nova*, 29(3): 467-470.
- Neto, L.G.; Lopes, N.P. 2007. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*, 30(2): 374-381.
- Oliveira, J.A. 1992. Efeito do tratamento fungicida em sementes e no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativus* L.) e pimentão (*Capsicum annuum* L.). *Ciência e Prática*, 16(1): 42-47.
- Salgado, A.P.S.P.; Cardoso, M.G.; Souza, P.E.; Souza, J.A.; Abreu, C.M.P.; Pinto, J.E. B.P. 2003. Avaliação da atividade fungitóxica de óleos essenciais de folhas de *Eucalyptus* sobre *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinérea* e *Bipolaris sorokiniana*. *Ciência e Agrotecnologia*, 27(2): 249-254.
- Sousa, M.M.M.; Lédo, F.J.S.; Pimentel, F.A. 2001. Efeito da adubação e do calcáreo na produção de matéria seca e de óleo essencial de pimenta longa. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 36(3): 405-409.
- Takarada, K.; Kimizuka, R.; Takahashi, N.; Honma, K.; Okuda, K.; Kato, T. 2004. A comparison of the antibacterial efficacies of essential oils against oral pathogens. *Oral Microbiology and Immunology*, 19:61-64.
- Wadt, L.H.O.; Kageyama, P.Y. 2004. Estrutura genética e sistema de acasalamento de *Piper hispidinervum*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 39(2): 151-157.

Recebido em 13/02/2008

Aceito em 06/05/2008

