



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO
DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS,
AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
CURSO DE BACHARELADO EM BIOLOGIA**



ELIANE DA SILVA BRAULIO

**PRODUÇÃO, RENDIMENTO E POTENCIAL ANTIFÚNGICO DO ÓLEO
ESSENCIAL DE *Melissa officinalis* L, TRATADAS COM *Natrum muriaticum* E
Trichoderma asperellum SOB O *Aspergillus welwitschiae***

CRUZ DAS ALMAS, BAHIA

2021

ELIANE DA SILVA BRAULIO

**PRODUÇÃO E RENDIMENTO DE ÓLEO ESSENCIAL DE *Melissa officinalis* L
TRATADAS COM *Natrum muriaticum* E *Trichoderma asperellum* E POTENCIAL
ANTIFÚNGICO DO ÓLEO ESSENCIAL SOB *Aspergillus welwitschiae***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao colegiado do curso de Bacharelado em Biologia da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito parcial para obtenção do Grau de Bacharel em Biologia, sob a orientação da Profa. Dra. Cintia Armond.

CRUZ DAS ALMAS, BAHIA

2021

TERMO DE APROVAÇÃO DO TRABALHO DE
CONCLUSÃO DE CURSO

ELIANE DA SILVA BRAULIO

**“PRODUÇÃO, RENDIMENTO E POTENCIAL ANTI-FÚNGICO DO ÓLEO
ESSENCIAL DE MELISSA (*depressa officinalis* L.), TRATADAS COM *Nastrum
muriaticum* E *Trichoderma asperellum* SOB O *Aspergillus nidulans*”**

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dra. Cintia Ammond
Orientadora

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFREB)



Prof. Dra. Francieli da Silva
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFREB)



Mestranda Fernanda de Azevedo Souza
Universidade Federal de Sergipe (UFS)

CRUZ DAS ALMAS

Agosto-2021

Dedicatória

*Ao meu filho Henrique;
Aos meus pais, a meu esposo;
As minhas irmãs e meu sobrinho Miguel.
Dedico*

Epígrafe

*Biologia é lindo! Quando observamos de
pertinho nosso corpo e suas reações vemos
como Deus é perfeito!! Temos um
UNIVERSO dentro de nós!!
(Richelli Parreira)*

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer, em primeiro lugar, a Deus, por mim dar saúde e forças para superar todos os momentos difíceis a que me deparei ao longo da minha graduação e pela força e coragem durante toda esta longa caminhada que foi vencida com muito esforço, e que hoje com muita felicidade posso dizer valeu a pena.

Aos meus pais Maria da Conceição Braulio e Roque Braulio e minhas irmãs Caroline Braulio e Caliane Braulio, por todo o incentivo durante todos esses anos de estudo, dando-me força para não desistir.

Ao meu noivo Jorge Luiz pela compreensão e apoio, sendo um grande companheiro, e incentivando a não desistir quando o cansaço e o desânimo insistia em me fazer desistir.

Ao meu filho Henrique Gabriel que é a razão do meu viver, maior presente que Deus me presenteou, e ao meu sobrinho Miguel Braulio, que é minha preciosidade.

Aos meus queridos e amados primos, Manuele, Renan e Jayne, por me proporcionarem alegria em todos os momentos, por serem belas crianças.

Aos meus grandes amigos da faculdade em especial Fernanda de Azevedo, Polyana Oliveira, Leia Mota, Geovana Vieira, Lucas Curi que permitiram que essa caminhada fosse mais alegre e que mesmo com tantas dificuldades estávamos todos juntos um apoiando o outro.

À professora Cintia Armond por aceitar ser minha orientadora, pela atenção e pelo suporte, pela dedicação em ajudar e por me dá apoio nos momentos mais difíceis no decorrer do experimento, e por me mostra que apesar do meus medos e nervosismo posso superá-lo, me tornando uma ótima profissional.

A todos os professores do curso, que foram tão importantes na minha vida acadêmica e no meu desenvolvimento, sendo pacientes, verdadeiros mestres, me mostrando que o conhecimento é tudo.

Á Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB) por me acolher durante esses anos de luta e dedicação, me proporcionando conhecimentos valiosos, que irão ser a base da minha vida profissional. O local que se tornou minha segunda residência.

Ao laboratório de fitoquímica e a toda equipe, a professora Franceli e a Thaís Feijó por toda paciência apoio e disponibilidade durante as pesquisas, a Vanessa Ferreira que em momentos de aflição independente da hora não se opôs a me ajudar e a técnica do laboratório Lene por estar sempre disposta a ajudar.

É chegado ao fim um ciclo de muitas risadas, choro, felicidade e frustrações. Sendo assim, dedico este trabalho a todos que fizeram parte desta etapa da minha vida, enfim a todos que contribuíram e me incentivaram de forma direta e indireta para realização deste trabalho.

BRAULIO, Eliane da Silva, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Agosto. 2021. **PRODUÇÃO E RENDIMENTO DE ÓLEO ESSENCIAL DE *Melissa officinalis* L TRATADAS COM *Natrum muriaticum* E *Trichoderma asperellum* E POTENCIAL ANTIFÚNGICO DO ÓLEO ESSENCIAL SOB *Aspergillus welwitschiae***

Orientadora: Dra. Cintia Armond.

RESUMO

A utilização da homeopatia na agricultura vem sendo cada vez mais consolidada como tecnologia social efetiva e sustentável na produção vegetal. Através de resultados significativos na disponibilidade de nutrientes, crescimento vegetal, aumento da resistência das plantas a fatores abióticos e no controle de pragas e doenças. O óleo de essencial de *Melissa officinalis* L. possui potencial antifúngico, que vem sendo testado no controle de fitopatógenos em várias culturas. O fungo *Aspergillus welwitschiae*, é responsável pela podridão vermelha na cultura do sisal. Diante disso, o objetivo no trabalho foi avaliar a produção e rendimento de óleo essencial de *Melissa officinalis* L. tratadas com *Natrum muriaticum* e *Trichoderma asperellum* e validar o potencial antifúngico do óleo essencial sob *Aspergillus welwitschiae*. O delineamento utilizado foi em blocos casualizados, com 3 tratamentos e 1 controle, com 40 repetições, totalizando 160 unidades experimentais. Os tratamentos foram constituídos do medicamento homeopático e fungo *Trichoderma asperellum*: T1: *Natrum muriaticum* 5CH + *Trichoderma*; T2: *Natrum muriaticum* 5CH; T3: Fungo e o controle água. A determinação da Concentração Mínima Inibitória foi realizada conforme as técnicas padronizadas pelo NCCLS, na qual foram realizadas diluições seriadas do óleo essencial, obtendo concentração final de: 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,315 $\mu\text{L}/\text{mL}^{-1}$, em placas de Elisa e logo após foram incubadas em B.O.D a 28 °C por 72 horas. Foram realizados testes para avaliar o efeito fungicida/fungistático do óleo essencial sob o fungo. Para isso foram preparadas 4 placas de Petri com meio BDA para realização da avaliação visual do crescimento micelial do fungo, as placas foram vedadas, e incubadas em B.O.D. por 72 horas a 28°C. Os parâmetros fitotécnicos avaliados foram: altura (ALT), massa seca da parte aérea (MSP), massa fresca da parte aérea (MFP) e rendimento de óleo essencial (ROE), que foram submetidos à análise estatística no programa computacional R. Quanto aos testes antimicrobianos foram analisados visualmente o crescimento micelial do fungo. O uso do medicamento homeopático + a inoculação com *Trichoderma asperellum* promoveu a maior produtividade das plantas, o medicamento *Natrum muriaticum* 5CH influenciou no rendimento de óleo essencial de melissa e o óleo essencial possui efeito antifúngico sob o *A. welwitschiae*.

Palavras-Chave: Agricultura autorregulável, bioativos, homeopatia, efeito biológico.

BRAULIO, Eliane da Silva, Federal University of Recôncavo da Bahia, August, 2021. **Production and yield of essential oil from *Melissa officinalis* L treated with *Natrum muriaticum* and *Trichoderma asperellum* and antifungal potential of the essential oil under *Aspergillus welwitschiae*.** Advisor: Dr. Cintia Armond.

ABSTRACT

The use of homeopathy in agriculture has been increasingly consolidated as an effective and sustainable social technology in plant production. Through significant results in nutrient availability, plant growth, increased plant resistance to abiotic factors and pest and disease control. *Melissa officinalis* L. essential oil has antifungal potential, which has been tested in the control of phytopathogens in several cultures. The fungus *Aspergillus welwitschiae* is responsible for red rot in sisal culture. Therefore, the objective of this work was to evaluate the production and yield of essential oil of *Melissa officinalis* L. treated with *Natrum muriaticum* and *Trichoderma asperellum* and to validate the antifungal potential of the essential oil against *Aspergillus welwitschiae*. The design used was randomized blocks, with 3 treatments and 1 control, with 40 replications, totaling 160 experimental units. The treatments consisted of the homeopathic medicine and *Trichoderma asperellum* fungus: T1: *Natrum muriaticum* 5CH + *Trichoderma*; T2: *Natrum muriaticum* 5CH; T3: Fungus and water control. The essential oil and the essential oil had an antifungal effect on *A. welwitschiae*. The determination of the Minimum Inhibitory Concentration was carried out according to the techniques standardized by the NCCLS, in which serial dilutions of the essential oil were carried out, obtaining a final concentration of: 5; 2.5; 1.25; 0.625; 0.315 $\mu\text{L}/\text{mL}^{-1}$, in Elisa plates and then incubated in B.O.D at 28 °C for 72 hours. Tests were carried out to evaluate the fungicidal/fungistatic effect of the essential oil on the fungus. For this, 4 Petri dishes with PDA medium were prepared to perform the visual evaluation of the fungus mycelial growth, the plates were sealed, and incubated in B.O.D. for 72 hours at 28°C. The phytotechnical parameters evaluated were: height (ALT), shoot dry mass (MSP), shoot fresh mass (MFP) and essential oil yield (ROE), which were submitted to statistical analysis in the R computer program. Antimicrobial tests were visually analyzed for fungal mycelial growth. The use of homeopathic medicine + inoculation with *Trichoderma asperellum* promoted higher plant productivity, the medicine *Natrum muriaticum* 5CH influenced the yield of melissa essential oil and the essential oil had an antifungal effect on *A. welwitschiae*.

Keywords: Self-regulating agriculture, bioactives, homeopathy, biological effect.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

FIGURA 1: Avaliação de altura das plantas de *M. officinalis* dentro do intervalo de aplicação dos tratamentos, no primeiro ciclo de produção.

FIGURA 2: Rendimento do óleo essencial das plantas de *Melissa officinalis* tratados com medicamento homeopático *Natrum muriaticum* e fungo *Trichoderma* spp. (TCS80).

FIGURA 3: Avaliação de altura das plantas de *M. officinalis* dentro do intervalo de aplicação dos tratamentos, no segundo ciclo de produção.

CAPÍTULO 2

FIGURA 1: Disposição dos tratamentos na placa de Elisa contendo o meio de cultivo BD, preparada para o teste de concentração mínima inibitória.

FIGURA 2: Crescimento micelial observado 72 horas após inoculação dos fungos na placa de Petri. Tratamento 1 (*Natrum muriaticum* 5CH + TCS81); Tratamento 2 (*Natrum muriaticum* 5CH) e controle nas concentrações de 5,0; 2,5 $\mu\text{L}/\text{mL}^{-1}$ de óleo essencial de *M. officinalis*.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

TABELA 1: Dados da massa fresca da parte aérea (MFPA) e massa seca da parte aérea (MSPA) e rendimento do óleo essencial (ROE) da planta de *Melissa officinalis* na primeira fase de aplicação do tratamento homeopático *Natrum muraticum* e fungo *Trichoderma* spp. (TCS80).

TABELA 2: Dados da massa fresca da parte aérea (MFPA) massa seca da parte aérea (MSPA) e rendimento do óleo essencial (ROE) das plantas de *Melissa officinalis* L. submetidas ao tratamento homeopático *Natrum muraticum* e fungo *Trichoderma* spp. (TCS80) no segundo ciclo de produção.

CAPÍTULO 2

TABELA 1: Resultados do teste de concentração mínima inibitória (MiC), do óleo essencial de *M. ofcinallis* L. tratados com *Natrum muriaticum* 5CH e inoculação de *T. asperellum* (TCS81), sob o fungo *A. welwitschiae*, Cruz das Almas/BA, 2019.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	2
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
Homeopatia na Agricultura	13
Medicamentos Homeopáticos.	14
<i>Natrum muriaticum</i>	14
Caracterização do <i>Trichoderma</i> sp. e Seu Uso na Agricultura.....	15
Caracterização da <i>Melissa officinalis</i> L. e Uso de Óleos Essenciais.....	16
<i>Aspergillus welwitschiae</i> e o Teste de Concentração Mínima Inibitória.....	17
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	17
CAPÍTULO I	22
INTRODUÇÃO	22
OBJETIVOS	23
METODOLOGIA	24
Delineamento Experimental.	24
Plantio e Transplante das Mudanças.	24
Obtenção dos Resíduos Orgânicos na Composição do Substrato.	24
Preparações do Isolado <i>Trichoderma spp.</i> e da Solução Homeopática e Aplicação.	25
Avaliações Fitotécnicas de Plantas de <i>Melissa Officinalis</i> L	25
Extração de Óleo Essencial	26
RESULTADOS	26
DISCUSSÃO	30
CONCLUSÃO	32
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
CAPÍTULO II	35
INTRODUÇÃO	36
METODOLOGIA	36
Determinação do Potencial Antimicrobiano.....	39
Ensaio Antifúngico.....	39
Efeito Fungicida/Fungistático	40
Análise dos Dados.	41
RESULTADOS	40
DISCUSSÃO	41
CONCLUSÃO	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
CONCLUSÃO GERAL	Erro! Indicador não definido.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A intensificação da produção agrícola se tornou expressiva com o desenvolvimento econômico associado à Revolução Industrial e o aumento da população no planeta, com isso, resultando em maiores problemas ambientais, sobretudo o aquecimento global ocasionado pelas emissões de gases de efeito estufa (GEEs) (PAIXÃO e BACHA, 2015). A preocupação da sociedade em relação aos danos provocados pelo setor agrícola, tem despertado o interesse em adotar práticas sustentáveis com menores impactos ambientais que favoreçam o aumento da produtividade das culturas. Atuando no manejo fitossanitário e na redução do custo de produção (COSTA *et al.*, 2016).

A *Melissa officinalis* L. é uma planta medicinal com vantagens do ponto de vista econômico e ecológico, e vem sendo uma fonte de renda aos agricultores (RUÍZ-BALTAZAR *et al.*, 2017). Esta espécie possui propriedades medicinais e seu óleo essencial contém substâncias biologicamente ativas, principalmente contra microrganismos fitopatógenos (PEIXINHO *et al.*, 2017; RUÍZ-BALTAZAR *et al.*, 2017).

A partir de 2004, a homeopatia foi certificada como Tecnologia Social efetiva pela UNESCO/Fundação Banco do Brasil, visto que a homeopatia é aplicada a agricultura significativamente na qualidade ambiental e na maior segurança aos trabalhadores rurais e aos consumidores, auxiliando na promoção da produção de alimentos saudáveis (ANDRADE, 2001).

A utilização de substâncias ultradiluídas na produção agrícola de alimentos orgânicos e plantas medicinais está na Instrução Normativa de nº 46 de 2014 (BRASIL, 2014). Essas substâncias atuam nos processos biológicos das plantas, sem gerar resíduos ao meio ambiente (ESPINOZA, 2001).

O *Natrum muriaticum* é um medicamento homeopático, obtido do cloreto de sódio, é indicado para condições edafoclimáticas não favorável ao desenvolvimento de plantas, além de ser indicado em condições de estresses abióticos como seca e geada, em situação de salinidade pode agir na regulação osmótica dos vegetais e no desequilíbrio de fósforo e potássio no solo (BONATO *et al.*, 2006; TICHAVSKÝ, 2009). Também pode ser empregado no manejo fitossanitário, na nutrição e no incremento da produção de culturas (GONÇALVES *et al.*, 2011; GONÇALVES, *et al.*, 2012a; GAMA *et al.*, 2015).

As plantas medicinais além das ações farmacológicas no tratamento de doenças, vêm sendo empregadas no controle de diversos fitopatógenos e seu efeito tem sido evidenciado com frequência, agindo na inibição do desenvolvimento dos mesmos, frente às diferentes concentrações dos bioativos testados (BORGES *et al.*, 2013; BONA *et al.*, 2014; RUÍZ-BALTAZAR *et al.*, 2017), por meio da aplicação de óleos essenciais (BENATO *et al.*, 2016; PEIXINHO *et al.*, 2017 ARAÚJO e TEBALDI, 2019).

O fungo do gênero *Trichoderma* possui mecanismos de ação para o biocontrole de doenças como competição e parasitismo, induzindo a resistência das plantas ao ataque do patógeno (BAE, *et al.*, 2016) por constituírem fontes de enzimas degradadoras de parede celular são ainda, importantes produtores de antibióticos de fungos fitopatogênicos (KUMAR *et al.*, 2012).

O *Aspergillus welwitschiae* é um fungo fitopatogênico encontrados em regiões áridas e semiáridas, responsável por causar a podridão vermelha do sisal (*Agave sisalana*) que contaminam as plantas em qualquer estágio de desenvolvimento, causa descoloração e podridão dos tecidos internos do caule, conseqüentemente a senescência da mesma (ABREU, 2010; DUARTE *et al.*, 2018). No qual, tem limitado a produtividades das culturas de sisal (GUIDO *et al.*, 2018). Até então, não há um controle efetivo eficaz desta doença, sendo necessário a adoção de biotecnologias, a fim de, controlar o manejo desse fitopatógeno (PANDEY *et al.*, 2017).

Diante disso, o objetivo no trabalho foi avaliar a produção e rendimento de óleo essencial de *Melissa officinalis* L. tratadas com *Natrum muriaticum* e *Trichoderma asperellum* e validar o potencial antifúngico do óleo essencial sob *Aspergillus welwitschiae*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Homeopatia na Agricultura

Homeopatia é a Ciência que se baseia na homeostase do ser vivo, a partir da aplicação dos medicamentos que agem na estabilidade química e física do organismo a fim de, exercer normalmente as funções nos seres vivos (GRAMS, 2019) promovendo a autorregulação do organismo.

A homeopatia é uma palavra originária do grego, que significa *homeos* (Semelhante) e *phatos* (Doença), elucidada pelo médico Christian Friedrich Samuel Hahnemann, na Alemanha, e dispersou por meio da publicação do livro –Organon da arte de curar no ano de 1810 (BRACCINI *et al.*, 2019).

Os medicamentos homeopáticos são obtidos a partir de diversas substâncias sendo de origem mineral, animal, vegetal ou produtos químicos, para a elaboração dos preparados homeopáticos com produtos oriundos de vegetais podem ser utilizadas as plantas inteiras ou apenas partes e também produtos extraídos dela ou sintetizados em seu metabolismo secundário (RUEDA, 2013; RELTON *et al.*, 2017; PINHEIRO *et al.*, 2019).

De acordo com Pinheiro *et al.* (2019), a homeopatia busca a homeostase do indivíduo, agindo através de estímulos energéticos e são desencadeados por medicamentos homeopáticos que tem como finalidade de reestabelecer a autorregulação do ser vivo, tendo em consequência de estresses bióticos ou abióticos.

Segundo Constantino *et al.* (2017), a eficácia dos preparados homeopáticos tem trazido benefícios ao cultivo de plantas, como favorecer a capacidade de resistência a agentes estressores e aumento da produção de bioativos. A homeopatia traz a autonomia do agricultor familiar, sendo prática de manejo de baixo custo, acessível, simples preparação e não gera resíduos no meio ambiente (PONTES *et al.*, 2012). O que a torna uma tecnologia social efetiva e de fácil aplicação e favorece a inclusão social.

Utilizada na produção agrícola no controle de alguns fitopatógenos causadores de perdas econômicas, pode ser uma ótima inovação no manejo de doença reduzindo o uso de insumos químicos (ANDRADE E CASALI, 2004).

2.2. Medicamentos Homeopáticos

A produção com bases agroecológicas estão se fortalecendo em todo mundo, devido à busca e hábitos de vida mais saudáveis e que acarrete menor impacto ao meio ambiente (PULIDO *et al.*, 2017). Sendo assim, os medicamentos homeopáticos têm como base as tinturas-mãe, sendo iniciados os processos das diluições seriadas, originando soluções ultradiluídas (PINHEIRO *et al.*, 2019). Podem ser aplicados em indivíduos sadios quanto doentes na dinamização apropriada, permitindo o conhecimento dos efeitos de patogênese da substância testada ou da homeostase do indivíduo doente (ALMEIDA; SANTOS, 2016).

2.3. *Natrum muriaticum*

O *Natrum muriaticum* é um medicamento homeopático obtido a partir do sal marinho do cloreto de sódio (NaCl), no qual é utilizado de acordo com os princípios de

semelhança e doses mínimas. É indicado como medicamento homeopático na aclimação de plantas em locais com condições edafoclimáticas que não são apropriadas ao seu desenvolvimento (BONATO *et al.*, 2006). Também recomendada para condições de estresses provocados por seca e geada, pode agir na regulação osmótica das plantas em casos de salinidade e na regulação do teor de fósforo e potássio no solo (TICHAVSKÝ, 2009), além de ser utilizado no manejo fitossanitário e nutrição de planta, com incremento de produtividade (GONÇALVES, *et al.*, 2012a; GAMA *et al.*, 2015).

O *Natrum muriaticum* na dinamização 12CH incrementou a massa de bulbos e reduziu a incidência de tripses em plantas de cebola cultivadas em sistema de cultivo orgânico (GONÇALVES *et al.*, 2011). *Natrum muriaticum* 12CH aumentou nos níveis de P, Fe, Si e K, em bulbos de cebola em sistema de produção orgânico (GONÇALVES, *et al.*, 2012a). Segundo Gama *et al.* (2015), verificaram a atividade antifúngica do *Natrum muriaticum* na dinamização 5CH obteve como resultados a inibição do crescimento micelial do fungo *Aspergillus niger* em 66%.

2.4. Caracterização do *Trichoderma* sp. e o uso na Agricultura

Os fungos do gênero *Trichoderma*, pertencem a classe Ascomycota, são endofíticos e simbióticos, possuem mais de 30 espécies e mais de 100 subespécies, que possuem inúmeros conídios, que originam as estruturas denominadas conidióforos, que são emergidos diretamente das hifas (DILDEY *et al.*, 2014; JUNGES *et al.*, 2016).

O *Trichoderma* é encontrado geralmente em solos de regiões que apresentam clima temperado e tropical, são de vida livre, sua reprodução é assexuada (MACHADO *et al.*, 2012). Colonizam a rizosfera das plantas, estabelecendo a simbiose no qual, se beneficiam de substâncias orgânicas e em troca as plantas se beneficiam por via da disponibilização de nutrientes, absorção do ácido indol acético, contribuindo na solubilização de fosfatos (CHAGAS *et al.*, 2017). A coleta e uso de isolados de fungos do gênero *Trichoderma* são próximos das lavouras e compõe uma excelente estratégia de controle (BERNARDO, *et al.*, 2019).

Os fungos *Trichoderma* têm sido utilizados com bastante sucesso como agentes de biocontrole, promotores de crescimento, no progresso da germinação e sanidade de sementes (ETHUR *et al.*, 2006). Espécies de *Trichoderma* são adequados a suprimir o desenvolvimento de vários organismos patogênicos, tais como *Pythium ultimum* Trow

1901, e *Phytophthora* spp. e seus mecanismos antagonistas podem ser influenciados pelo tipo de solo, condições de temperatura e umidade, além da microbiota associada (Howel, 2003). Pesquisas tem comprovado que fungos do gênero *Trichoderma* são bons componentes na promoção do crescimento vegetal (SOUZA *et al.*, 2016b).

Os fungos do gênero *Trichoderma* são simbioses de plantas, competidores da rizosfera e constituem fontes de enzimas degradadoras de parede de outros fungos. São ainda, importantes produtores de antibióticos e parasitas de fungos fitopatogênicos (KUMAR *et al.*, 2012).

2.5. Caracterização da *Melissa officinalis* L. e aplicação dos Óleos Essenciais

Melissa officinalis L. é uma planta nativa da região que circunda o Mediterrâneo e a Ásia, conhecida popularmente como erva-cidreira, pertence à família Lamiaceae, quando cultivada pode atingir de 20 a 80 cm de altura, os caules são ramificados a partir da base, formam touceiras (REIS *et al.*, 2009). Sendo facilmente encontrada e cultivada em todo o país (MEIRA, 2012). As folhas são verde-escura, ovais, pilosas e com nervuras bem acentuadas. As flores podem ser brancas ou amarelas, em fascículos de 2 a 6 unidades com florescimento na maioria das vezes, de outubro a março, podendo variar por região (SOUZA *et al.*, 2016a).

O cultivo de *Melissa officinalis* em locais protegido oferece melhores resultados de biomassa, maior rendimento de óleo essencial e seu composto majoritário é o citral (LUZ *et al.*, 2014).

O óleo essencial é originário do metabolismo secundário das plantas, possuem composição química complexa e são considerados fontes de substâncias biologicamente ativas, principalmente contra microrganismos (PEIXINHO *et al.*, 2017). Os óleos essenciais são produtos naturais, não causam impacto ambiental, como os agroquímicos, sendo inovador no manejo e no controle de doenças (ARAÚJO e TEBALDI, 2019).

A ISO (International Standard Organization), define óleos voláteis como os produtos obtidos de diferentes partes de plantas, são substâncias complexas, voláteis, geralmente com odor, extraídas por métodos de destilação simples ou por arraste a vapor. O rendimento dos óleos essenciais, podem ser interferidos por diversos fatores, bem como, técnicas de manejo, temperatura, espécie vegetal, modo de secagem, época e método da colheita e a parte da planta que foi utilizada na extração do óleo (FEITOSA, *et al.*, 2014).

2.6. *Aspergillus welwitschiae* e o Teste de Concentração Mínima Inibitória

O gênero *Aspergillus* constitui um grupo de fungos filamentosos com 339 espécies com ampla distribuição geográfica, sendo que algumas dessas espécies são consideradas patogênicas para vegetais e animais (SANSOM *et al.*, 2014; ABDEL-AZEEM *et al.*, 2016). O *Aspergillus welwitschiae*, encontrados em regiões áridas e semiáridas, são fungo saprofítico oportunista com comportamento necrotrófico, causam sintomas como o amarelecimento e murcha das folhas que evolui para a podridão do caule e morte da planta (DUARTE *et al.*, 2018).

Os fungos fitopatogênicos são considerados um dos fatores que mais limitam a produção agrícola e sua abundância dificulta o controle (GUIDO *et al.*, 2018). O fungo *Aspergillus welwitschiae* causa uma doença denominada podridão vermelha do sisal (*Agave sisalana*) (DUARTE *et al.*, 2018), contaminam a planta em qualquer estágio de desenvolvimento e causa descoloração e podridão dos tecidos internos do caule, e conseqüentemente senescência da planta (ABREU, 2010). Essa doença ainda não possui métodos de controle eficazes, com surgimento de microrganismos mais resistentes as medidas de controles utilizadas, torna-se necessário a adoção de novas biotecnologias, a fim de, controlar a doença (PANDEY *et al.*, 2017). E os produtos químicos fitossanitários, comumente utilizados no controle de doenças tem causados sérios problemas ambientais e prejudicando a saúde humana (BRUM *et al.*, 2014).

O uso de extratos vegetais e óleos essenciais podem ser uma inovação eficaz no controle de doenças, levando em consideração o potencial antimicrobiano mediante algumas atividades biológicas já validadas (BENATO *et al.*, 2016; PEIXINHO *et al.*, 2017; ARAÚJO e TEBALDI, 2019). Sua ação atua tanto na ação antimicrobiana como indutora de resistência (KNAAK e FIUZA, 2010).

A susceptibilidade antimicrobiana pode ser avaliada pela determinação da concentração inibitória mínima (CIM) (SALVARANI *et al.*, 2008). Pesquisas vêm utilizando a técnica da diluição em placas de Petri na determinação da concentração inibitória mínima, uma vez que, esta técnica apresenta a vantagem por possuir um detalhamento técnico bem definido no fornecimento de dados quantitativos (SALVARANI *et al.*, 2008; PALMEIRA *et al.*, 2010; BONA *et al.*, 2014).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-AZEEM, A. M; SALEM, F. M; ABDEL-AZEEM, M. A; NAFADY, N. A; MOHESIEN, M. T; SOLIMAN, E. A. (2016). Biodiversity of the *Genus Aspergillus* in different habitats. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*. Elsevier. [S.L], p. 28-33, 2016.

ABREU, K. C. L. M. **Epidemiologia da podridão vermelha do sisal no Estado da Bahia**. 2010. 100 p. Tese de Doutorado (Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias). Cruz das Almas, Bahia. 2010.

ANDRADE, M.C. **Homeopatia e as plantas medicinais**. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO SOBRE HOMEOPATIA NA AGROPECUÁRIA ORGÂNICA, Pinhal, Resumos... Pinhal-SP, n. 2, 2001. p.37.

ARAÚJO, V. C.; TEBALDI, N. D. Intervalo de aplicação de óleos essenciais no controle da mancha bacteriana do tomateiro, **Summa phytopathol**, v. 45 n.2, 2019.

BAE, S. J.; MOHANTA, T. K.; CHUNG, J. Y.; RYU, M.; PARK, G.; SHIM, S.; HONG, S. B.; SEO, H., BAE, D. W.; BAE, I.; KIM, J. J.; BAE, H. *Trichoderma* metabolites as biological control agents against *Phytophthora pathogens*. **Biological control**, v.92, p.128-138, 2016.

BENATO, E. A.; BELLETTI, T.C.; TERAPO, D.; FRANCO.; D.A.S. Controle de *Penicillium digitatum* em laranja pós-colheita com uso de óleos essenciais e outros métodos. / *Penicillium digitatum* control in postharvest orange with use of essential oils and other methods. In: Congresso brasileiro de fitopatologia, 48.; Congresso brasileiro de patologia pós colheita, 2., 2015, São Pedro, SP. Fitopatologia de precisão - fronteiras da ciência: anais. [Brasília, DF]: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2015. **Embrapa - Meio Ambiente**, 2016.

BERNARDO, J. T. et al. Isolamento on farm de *Trichoderma*: uma ferramenta no controle de doenças de solo para os agricultores no Brasil. **Revista Eletrônica Científica Da UERGS**, v. 5, n. 3, p. 263-270, 2019.

BONA, E. A. M.; PINTO, F. G. S.; FRUET, T. K.; JORGE, T. C. M.; MOURA, A. C. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.81, n.3, 2014.

BONATO, C. M. et al. Homeopatia simples: alternativa para a agricultura familiar. Marechal Cândido Rondon: **Gráfica Líder**, v. 3, 2006.

BORGES, D. I.; ALVES, E.; MORAES, M. B.; OLIVEIRA, D. F. Efeito de Extratos e Óleos Essenciais de Plantas na Germinação de Urediniósporos de *Phakopsora pachyrhizi*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 15, n. 3, p. 325-331, 2013.

BRASIL. **Instrução normativa nº 4, de 18 de junho de 2014**. Ministério da Saúde, 2014.

CASALI, V. W. D., CASTRO, D. M., ANDRADE, F.M. C., LISBOA, S. P. **Homeopatia: bases e princípios**. Viçosa: UFV, 2006. 140 p.

- CHAGAS, L. F. B.; CHAGAS J. A. F.; SOARES, L. P.; FIDELIS, R. R. *Trichoderma* na promoção do crescimento vegetal. **Revista de Agricultura Neotropical**, v. 4, n. 3, p. 97-102, 2017.
- COSTA, E. M.; CARVALHO, F.; NÓBREGA, R. S. A.; SILVA, J. S.; MOREIRA, F. M. S. Bacterial strains from floodplain soils perform different plant-growth promoting processes and enhance cowpea growth. **Scientia Agrícola**, v. 73, n. 4, p. 301-310, 2016.
- DILDEY, O. D. F; BARBIAN, J. M; GONÇALVES, E. D. V; BROETTO, L; ETHUR, L. Z; KUHN, O. J; BONETT L. P. Inibição do crescimento in vitro de *Sclerotinia sclerotiorum*, causador de mofo branco, por isolados de *Trichoderma* spp. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 12, n. 3, p. 132-136, 2014.
- DUARTE, E. A. A.; DAMASCENO, C. L.; OLIVEIRA, T. A. S.; BARBOSA, L. O.; MARTINS, F. M.; QUEIROZ SILVA, J. R.; LIMA, T. E. F.; SILVA, R. M.; KATO, R. B.; BORTOLINI, D. E.; AZEVEDO, V.; GÓES-NETO, A.; SOARES, A. C. F. Putting the Mess in Order: *Aspergillus welwitschiae* (and Not *A. niger*) Is the Etiological Agent of Sisal Bole Rot Disease in Brazil. **Frontiers in Microbiology**, 2018, 9, 1227.
- ESPINOZA, F. J. R. Agrohomeopatia: una opción ecológica para el campo mexicano. **La homeopatia de México**, México, v. 70, n. 613, p. 110-116, 2001.
- ETHUR, L. Z.; DA ROCHA, E. K.; MILANESI, P. _MUNIZ, M. F. B.; BLUME, E. Sanidade de sementes e emergência de plântulas de nabo forrageiro, aveia preta e centeio submetidas a tratamentos com bioprotetor e fungicida. **Ciência e Natura**, v. 28, n. 2, p. 17-27, 2006.
- FEITOSA, R. M; DANTAS, R. D. L; GOMES, W. C; MARTINS, A. N. A; ROCHA, A. P. T. Influência do método de extração no teor de óleo essencial de hortelã (*Mentha spicata* L.). 4. ed. Pombal - PB - Brasil: **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 9, 2014.
- GAMA, E. V. S.; SILVA, F.; SANTOS, I.; MALHEIRO, R.; SOARES, A. C. F.; PEREIRA, J. A.; ARMOND, C. Homeopathic drugs to control red rot disease in sisal plants. **Agronomy for Sustainable Development**, v; 35, p. 649-656, 2015.
- GONÇALVES, P. A. S.; BOFF, P.; BOFF, M. I. C.; NESI, C. N. Efeito da aplicação do preparado homeopático de *Natrum muriaticum* na incidência de *Thrips tabaci*, na produtividade e na armazenagem de cebola em sistema orgânico. **Revista Agropecuária Catarinense**, v.24, n. 2, p.76-78, 2011.
- GONÇALVES, P. A. S.; VIEIRA NETO, J.; CARVALHO, P. G. B. Efeito da pulverização foliar de preparados homeopáticos de *Natrum muriaticum* e calcário de conchas sobre a composição mineral de bulbos de cebola em sistema orgânico. **Agropecuária catarinense**, v. 25. n. 3, p.80-84, 2012a.
- GUIDO, Z; FEIJÓ, A. L. R; FERREIRA, F. D; GONÇALVES, C. R; HELLWIG, F. M; NETO, L. T. Avaliação das concentrações inibitória e fungicida mínima do óleo essencial de orégano sobre *Aspergillus flavus*. **Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão**, v. 9, n. 3, 2018.
- HOWEL, C. R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the vistora and evolution of current concepts. **Plant Disease**, v. 87, n. 1, p. 4-10, 2003.

JUNGES, E; MUNIZ, M. F; MEZZOMO, R; BASTOS, B; MACHADO, R. T. *Trichoderma* spp. na Produção de Mudanças de Espécies Florestais. **Araras**: 237-244 p. v. 23, n. 2, 2016.

KNAAK, N.; FIUZA, L.M. Potencial dos óleos essenciais de plantas no controle de insetos e microrganismos. **Neotropical Biology and Conservation**, v.5, n.2, p.120-132, 2010.

KUMAR, D. P.; THENMOZHI, R.; ANUPAMA, P. D.; NAGASATHYA, A.; THAJUDDIN, N.; PANEERSELVAM, A. Selection of potential antagonistic *Bacillus* and *Trichoderma* isolates from tomato rhizospheric soil against *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycoperscisi*. **Journal of Microbiology and Biotechnology Research**, v.2, p.78-89, 2012.

LUZ, J. M. Q.; SILVA, S. M.; HABBER, L. L.; MARQUEZ, M. O. M. Produção de óleo essencial de *Melissa officinalis* L. em diferentes épocas, sistemas de cultivo e adubações. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.16, n.3, p.552-560, 2014.

MACHADO, D. F. M; PARZIANELLO, F. R., SILVA, A. C. F. *Trichoderma* no Brasil: O fungo e o bioagente. **Revista de ciências agrárias**, [S.L.], v. 35, n. 1, p. 274-288, 2012.

MEIRA, M.R; MARTINS, E. R.; MANGANOTTI, S. A. Crescimento, produção de fitomassa e teor de óleo essencial de melissa (*Melissa officinalis* L.) sob diferentes níveis de sombreamento. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.14 n.2, 2012.

PALMEIRA, J. D.; FERREIRA, S. B.; SOUZA, J. H.; ALMEIDA, J. M.; FIGUEIREDO, M. C.; PEQUENO, A. S.; ARRUDA, T. A.; ANTUNES, R. MIRANDA P.; CATÃO, R. M. R. Avaliação da atividade antimicrobiana in vitro e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de extratos hidroalcolóico de angico sobre cepas de *Staphylococcus aureus*. **RBAC**, v. 42, n. 1, p. 33-37, 2010.

PAIXÃO, M. A. S.; BACHA, C. J. C, A agropecuária brasileira e a sua inserção na Economia Verde: uma análise do Plano e do Programa ABC, **Pesquisa & Debate**, v.26, n. 1(47) p.75-98, 2015.

PANDEY, A. K.; KUMAR, P.; SINGH, P.; TRIPATHI, N. N.; BAJPAI, V. K. Essential Oils: Sources of Antimicrobials and Food Preservatives. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 2161, 2017.

PEIXINHO, G. S.; RIBEIRO, V. G. R.; AMORIM, E. P. R. Controle da Podridão seca (*Lasiodiplodia theobromae*) em cachos de videira cv. Itália por óleos essenciais e quitosana. **Summa phytopathol**, v. 43, n.1, 2017.

REIS, É. S.; PINTO, J. E. B. P.; ROSADO, L. D. S.; CORRÊA, R. M. Teor e composição química do óleo essencial de *Melissa officinalis* L. in vitro sob influência do meio de cultura. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 31, n. 2, p. 331-335, 2009.

RUIZ-BALTAZAR. Á. J.; REYES-LÓPEZ. S. Y.; LARRAÑAGA. D.; ESTÉVEZ. M.; PÉREZ, R. Green synthesis of silver nanoparticles using a *Melissa officinalis* leaf extract with antibacterial properties. **Results in Physics**, v. 7, p. 2639-2643, 2017.

SALVARANI, F. M.; PINTO, F. F.; LOBATO, F. C. F.; ASSIS, R. A.; GONÇALVES, L. A.; MARTINS, N. É. CLEMENTINO, I. J.; COSTA, A. T. R. Concentração inibitória mínima (CIM) de oito antimicrobianos frente a isolados de *Streptococcus suis*. **Brazilian essential oils: general view, developments and perspectives**, v. 45, n. 1, p. 41-47, 2008.

SAMSON, R. A; VISAGIE, C. M; HOUBRAKEN, J; HONG, S.-B; HUBKA, V; KLAASSEN, C. H. W; FRISVAD, J. C. (2014). Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. **Studies in Mycology**, v.78, 141–173, 2014.

SOUZA, L. S. S. **Uso de *Trichoderma* spp. e materiais orgânicos como estratégias para o controle do mal-do-panamá**. 2016. 162 f. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Bahia, 2016a.

SOUZA, LM de S. et al. Potencial de solubilização de fosfato e produção de ácido indolacético por isolados de *Trichoderma* spp. In: Embrapa Amapá-Resumo em anais de congresso (ALICE). **In: JORNADA CIENTÍFICA DA EMBRAPA AMAPÁ**, v. 2, 2016b.

CAPÍTULO I

PRODUÇÃO E RENDIMENTO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Melissa officinalis* L. TRATADAS COM *Natrum muriaticum* 5CH E *Trichoderma asperellum*

INTRODUÇÃO

A homeopatia é uma ciência em que as substâncias consumidas em pequenas doses são capazes de curar os sintomas que essa mesma substância provoca no indivíduo sadio (PAIVA, 1998). O efeito de uso pode ser explicado a partir ultradiluições da mesma substância que produz o sintoma em organismo sadio pelo princípio *similia similibus curantur* (semelhante pelo semelhante se cura) que promove a autorregulação do ser vivo tratado (MARTINS *et.al*; 2015).

Agricultores de várias regiões do Brasil e mesmo de outros países vêm aplicando homeopatia em plantas, com resultados promissores no aumento da resistência e no controle de pragas e doenças, no florescimento e produção de mudas sadias (SILVA, *et al.*, 2016).

O avanço das pesquisas utilizando medicamentos homeopáticos, em vista dos seus benefícios e do interesse crescente na aplicação e no manejo da produção de plantas medicinais, tem apontado o crescimento de novas descobertas que vão expor as características que envolvem o mecanismo de ação das ultradiluições homeopáticas (TEXEIRA e CARNEIRO, 2017).

À aplicação do medicamento homeopático *Natrum muriaticum* melhora a aclimação das plantas em áreas impróprias ao crescimento e desenvolvimento, e indica também que plantas sob condições de estresse, devido à seca e congelamento, torna-se mais resistente, o medicamento é obtido a partir do sal marinho e aplicado de acordo com os princípios de semelhança e na experimentação em organismos sadios (SIQUEIRA *et al.*, 2010).

As plantas medicinais são espécies vegetais que possuem distintos tipos de princípios ativos, que podem agir no organismo animal e no próprio vegetal no combate a doenças, eliminando agentes causadores, como bactérias, fungos e vírus de modo geral. Além de proporcionar ação preventiva contra estes e diversos outros problemas de saúde (ALBUQUERQUE, 2010).

A *Melissa officinallis* L., é uma planta comestível usada em todo o mundo na forma de infusão, importante na prevenção de algumas doenças, com ação digestiva, analgésica, sedativa e antimicrobiana (DIAS *et al.*, 2012). Esta espécie possui composição química, rica em óleos essenciais que possuem interesse comercial pelas indústrias alimentícias e cosméticas na fabricação de aromatizantes e licores (SILVA e SILVA, 2011).

Óleos essenciais consistem em misturas de substâncias voláteis, lipofílicas, com baixo peso molecular, geralmente odorífera e líquida (AMARAL e BARROS, 2004). Constituídos na maioria das vezes, por moléculas de natureza terpênicas, comumente apresentam odor agradável e marcante, frequentemente extraídos das partes vegetais por meio do processo de extração de arraste à vapor d' água, (hidro destilação) (MOARAI, 2009). De acordo com o mesmo autor, estes, podem ser empregadas nas indústrias de alimentos, bebidas, produtos de higiene pessoal, cosméticos e para evitar ou diminuir a deterioração lipídica e a contaminação por micro-organismos.

Os óleos possuem uma versatilidade nos mecanismos de ação no biocontrole de doenças tais como competição e parasitismo, induzindo a resistência das plantas a doenças (LOUZADA, *et al.*, 2009; BAE, *et al.*, 2016). O *Trichoderma* spp. é um gênero fúngico largamente estudado e utilizado no controle biológico de muitos fitopatógenos (MACHADO e SILVA, 2013).

Devido à procura de um sistema agrícola que possa promover maior interação e maior biodiversidade dentro do meio produtivo formam-se cultivos mais sustentáveis, com menores índices de impactos ambientais e diminuição do uso de fertilizantes no sistema de cultivo (COSTA *et al.*, 2016). O *Trichoderma* spp. e a aplicação de medicamentos homeopáticos pode ser uma inovação tecnológica que favoreça a autorregulação tanto no metabolismo secundário das plantas quanto no fungo e no ambiente de forma sistêmica (KUMAR *et al.*, 2012; CHAGAS *et al.*, 2017; BERNARDO, *et al.*, 2019). Com isso pode-se levantar a hipótese que a inoculação do *Trichoderma* spp. e a aplicação de medicamentos homeopáticos, poderá transformar substâncias no metabolismo das plantas, devido a promoção do aumento da

disponibilidade de nutrientes e na tolerância ao estresse a partir da autorregulação entre o ser vivo e o ambiente de forma sistêmica.

OBJETIVO GERAL

Avaliar, quantificar a produção e o rendimento do óleo essencial de *Melissa Offcinalis* L. tratadas com o medicamento homeopático *Natrum muriaticum*, o fungo *Trichoderma* ou em associação medicamento+fungo *Trichoderma*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar os tratamentos *Trichoderma* spp, *Natrum muriaticum* ou associados que melhor (res) contribuem na produtividade de *Melissa officinalis*.L.
- Verificar entre o (s) tratamento (s) que promovem maior rendimento de óleo essencial de *Melissa officinalis*.L.

METODOLOGIA

O ensaio experimental foi desenvolvido em casa de vegetação localizada na Fazenda Experimental de Produção Vegetal nas dependências do CCAAB, no campus da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas/BA (Latitude: 12°40'39|S, Longitude: 39°06'23|W e Altitude: 220m).

Delineamento experimental

Neste experimento utilizou-se o delineamento em blocos casualizados, constituídos de 4 tratamentos, com 40 repetições, totalizando 160 unidades experimentais. Os tratamentos foram constituídos dos medicamentos homeopáticos e fungo *Trichoderma asperellum* (TCS 81): T1: *Natrum muriaticum* 5CH + TCS81; T2: *Natrum muriaticums* 5CH; T3: TCS 81 e o controle (água).

Os substratos utilizados foram: solo autoclavado, esterco bovino curtido na proporção 3:1 (p/p), sendo 1.5kg de solo, 500g de esterco bovino e palha de bananeira triturada (10g). Para a inoculação da suspensão com fungo *Trichoderma asperellum* (TCS 81), foi utilizada 5 mL da suspensão de esporos aplicados com pipeta diretamente no substrato de cada tratamento, exceto para o controle. Enquanto que para aplicação do

medicamento homeopático *Natrum muriaticum* foi utilizado 100 mL da solução sendo aspergidos no substrato uma vez a cada 7 dias durante os períodos de avaliação.

Plantio e transplante das mudas

O plantio foi por semeadura direta, sendo semeada 5 sementes depositadas em cada célula em bandeja, preenchidas com solo e esterco bovino na proporção 2:1 (solo: composto orgânico).

Com 45 dias as mudas foram selecionadas (escolheu-se as de maior vigor e com altura de aproximadamente 3 cm) e posteriormente, transferida para sacos de polietilenos de cor preta, com capacidade de 2 kg, preenchidos com substrato na proporção 1, 5:0,5: p/p (solo autoclavado e esterco bovino).

Obtenção dos Resíduos Orgânicos na Composição do Substrato

Foi utilizado o substrato de bananeira (*Musa spp.*), obtida de agricultores localizados no município de Cruz das Almas, Bahia. O material passou por secagem em estufa de circulação forçada de ar, por um período de quatro dias a 45 °C. Após a secagem, o material orgânico foi triturado em moinho do tipo Wiley, com peneira de 20 malhas por polegada. O material moído foi armazenado em saco plástico hermeticamente fechado, a temperatura ambiente, até o momento de sua incorporação e homogeneizado ao solo (10g substrato/2Kg de solo) (Souza, 2016).

Preparações do isolado *Trichoderma spp.* e da solução homeopática

O isolado de *Trichoderma spp* (TCS81) utilizado pertence à coleção do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Mandioca e Fruticultura, na Cidade de Cruz das Almas – BA. A cultura foi multiplicada em meio de cultura batata dextrose ágar (BDA), com incubação a temperatura ambiente ($25 \pm 1^\circ\text{C}$), por 7 dias. Após esse período, foram acrescentados 20 mL de água destilada esterilizada e duas gotas de Tween 20, a colônia foi raspada com alça de Drigalsk. A suspensão foi filtrada e os conídios foram contados em câmara de Neubauer, em microscópio óptico com aumento de 40 X, sendo ajustada a concentração de 10^6 conídios mL^{-1} com acréscimo de água destilada esterilizada.

A solução homeopática de aplicação foi preparada a parti da diluição de 1 mL da homeopatia correspondente em 1 L de água, na qual foi homogeneizada e aplicada 100 mL, sobre a parte aérea ao solo, por saco. A aplicação da homeopatia foi feita em

intervalos de sete dias até a colheita. A inoculação do fungo *Trichoderma* spp. próximo a raiz, onde realizou duas inoculações sendo a primeira no plantio e a segunda a um mês após o plantio.

Avaliações fitotécnicas de plantas de *Melissa Officinalis* L. determinação das alturas das plantas

Foram medidos o comprimento da parte aérea em intervalos de 8 dias, com o auxílio de uma régua graduada em cm, a partir do nível do solo até o ápice da planta.

Determinações da parte aérea fresca

Com 60 dias as plantas foram colhidas e realizadas a determinação de massa fresca, com auxílio de uma balança de precisão, com 3 casas decimais.

Determinações da parte aérea seca

Para determinação da massa seca foi obtida no processo de secagem por meio de estufa de ventilação forçada a 45 °C, até obter massa constante. E posteriormente feita a determinação da massa seca com auxílio de uma balança de precisão.

Extração e rendimento de óleo essencial

Para a extração de óleo essencial foi utilizada a parte aérea da planta, o procedimento foi realizado no laboratório de fitoquímica da UFRB, na qual seguiu a metodologia de SANTOS *et al.* (2004).

Para calcular o rendimento de óleo essencial utilizou-se a metodologia de GURGEL, (2009), onde a equação utilizada foi: $R (\%) = \frac{V_{oleo}}{P} \times 100$ onde "V" é o volume de óleo essencial coletado da coluna graduada do aparelho de extração "P" peso seco das amostras utilizadas para a extração.

Análise Estatística

Os dados foram tabulados e submetidos a análise de variância, teste de médias e regressão linear pelo programa computacional de sistema R (R Development Core Team, 2018).

RESULTADOS

Primeiro Ciclo de Produção das Plantas de *Melissa officinalis* L.

Os tratamentos influenciaram significativamente na produção e rendimento do óleo essencial da *Melissa officinalis* L., durante os primeiros 60 dias de aplicação dos tratamentos ($p < 0,05$) (Figura 1). Houve interação entre a dinamização 5CH de *Natrum muriaticum* e a inoculação com fungo *Trichoderma* spp.

Para variável altura no primeiro período de aplicação dos tratamentos não houve diferença significativa os tratamentos avaliados. Sendo que, a aplicação do *Natrum muriaticum* em conjunto com a inoculação do *Trichoderma*, apresentou maior crescimento em altura das plantas de *M. officinalis*, 11,97 cm planta⁻¹ (Figura 1).

No segundo período de avaliação da variável altura, houve um estímulo no crescimento das plantas de *M. officinalis* independente da presença ou ausência de inoculante. A interação entre o medicamento homeopático *Natrum muriaticum* e a inoculação com o *Trichoderma*, apresentaram maior crescimento em altura das plantas. Observa-se, que a cada aplicação do referente tratamento no intervalo de oito dias as plantas obtiveram maiores crescimento (25,27 cm planta⁻¹), quando comparado ao controle (Figura 1).

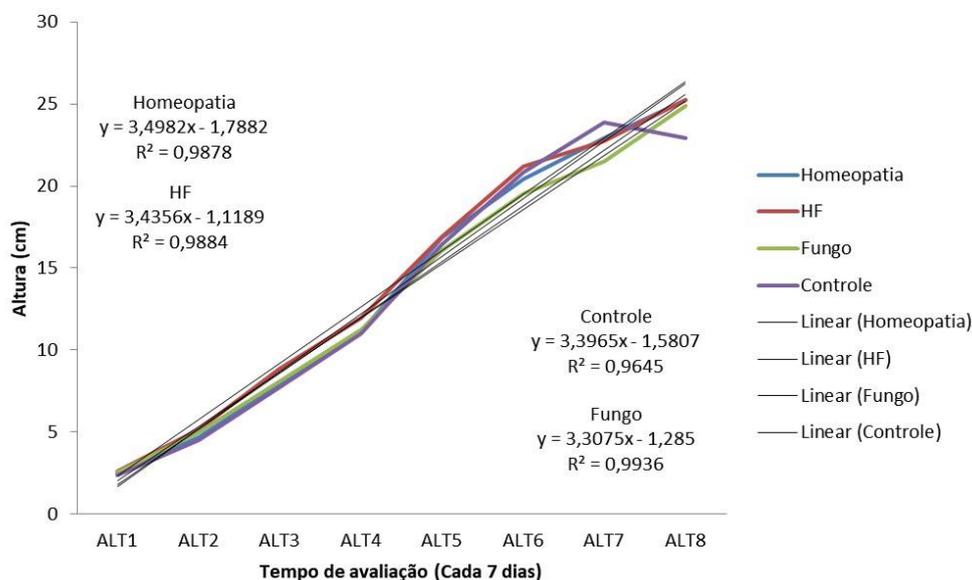


Figura 1: Avaliação de altura das plantas de *M. officinalis* dentro do intervalo de aplicação dos tratamentos, no primeiro ciclo de produção.

Na análise massa fresca (MFPA) as plantas tratadas com homeopatia e fungo, apresentaram maiores médias, comparado ao controle (Tabela 1). Este resultado está

relacionado com o teor de água na parte aérea que foi favorecido na associação fungo + homeopatia e a planta. Pode se inferir que a combinação homeopatia fungo favoreceu a relação ecológica e os serviços ecossistêmicos prestados favorecendo a MFPA nas plantas de melissa.

No entanto para a variável massa seca da parte aérea (MSPA), não foi observado efeito significativo entre os tratamentos avaliados na primeira aplicação dos tratamentos (Tabela 1). Tal resultado pode estar relacionado a dinamização utilizada no presente estudo, ou ainda que apesar dos tratamentos terem influenciado o teor de água na MFPA não influenciou no metabolismo primário, na incorporação de carbono visto que a MSPA não foi influenciada. A aplicação de *Natrum muriaticum* estimulou o rendimento do óleo essencial das plantas de *Melissa*, independente da presença do inoculante (Tabela 1).

Tabela 1. Dados da massa fresca da parte aérea (MFPA) e massa seca da parte aérea (MSPA) e rendimento do óleo essencial (ROE) da planta de *Melissa officinalis*, no primeiro ciclo de produção, tratadas com o tratamento homeopático *Natrum muriaticum* e fungo *Trichoderma* spp. (TCS80).

Tratamento	MFPA (g)	MSPA (g)	ROE (%)
Homeopatia	40.53 b	7.84 a	0.60 a
Homeopatia + fungo	50.02 a	7.71 a	0.57 ab
Fungo	41.00 b	7.53 a	0.45 ab
Controle	40.67 b	6.91 a	0.27 b
CV (%)	17.37	22.10	30.59
Média Geral	43.06	7.50	0.47

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

As plantas tratadas com homeopatia sem a inoculação tiveram um rendimento de 0,60% do óleo essenciais quando comparada ao controle (0,27%). Enquanto as plantas tratadas com homeopatia e inoculadas com *Trichoderma* spp, apresentaram um rendimento de 0,57% (Tabela 1). Tal resultado pode estar relacionado a influência tanto do *Natrum muriaticum*, quanto da inoculação do *Trichoderma*, no metabolismo secundário da *Melissa* que está relacionada fatores genéticos os quais tornam as plantas mais resistentes aos fatores ambientais, bem como, temperatura, intensidade de luz, conteúdo de água e deficiência nutricional, potencializando o rendimento de óleo essenciais, que possuem componentes químicos de interesse industrial e farmacêutico.

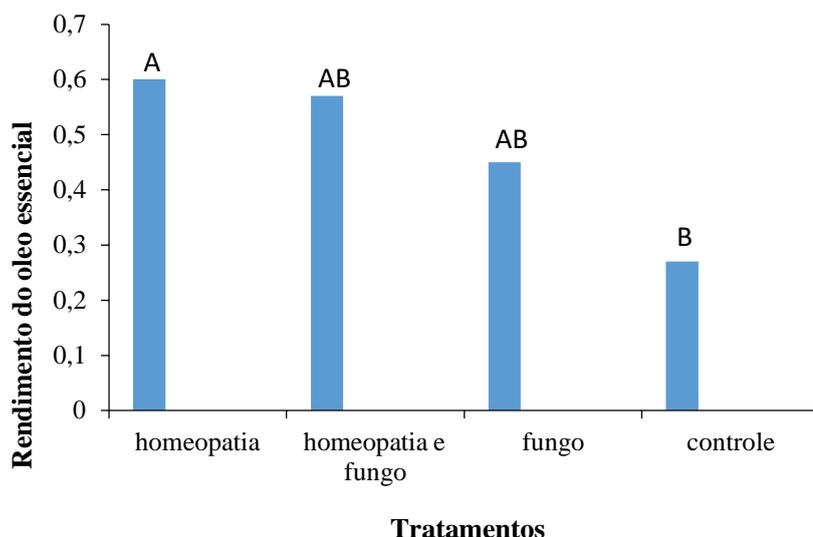


Figura 2. Rendimento do óleo essencial das plantas de *Melissa officinalis* L. tratados com medicamento homeopático *Natrum muriaticum* e fungo *Trichoderma* spp. (TCS80).

Entre os 30 e 120 dias de aplicação dos tratamentos verificou-se que houve interação entre a dinamização 5CH de *Natrum muriaticum* e a inoculação com fungo *Trichoderma* spp. para a variável altura, massa fresca e seca da parte aérea ($p < 0,05$) (Figura 1e 2 e Tabela 1).

Segundo Ciclo de Produção das Plantas de *Melissa officinalis* L.

No segundo ciclo de produção das plantas de *M. officinalis* L., a primeira avaliação da altura não teve diferença significativa. Enquanto que para segunda avaliação da altura após o rebrote, o tratamento *Natrum muriaticum* e *Trichoderma* spp., apresentou maior crescimento em altura com média de 5,18 cm planta⁻¹. O tratamento controle causou menor crescimento em altura com 4,5 cm planta⁻¹. Para a terceira avaliação da altura, o tratamento *Natrum muriaticum* e *Trichoderma* spp. Apresentaram maior crescimento em altura com 8,68 cm plantas⁻¹ (Figura 3). O tratamento controle apresentou menor crescimento em altura com 7,4 cm planta⁻¹.

Para a quarta e quinta avaliação da altura não houve diferença significativa entre os tratamentos avaliados, após o rebrote (Figura 3).

No entanto a sexta, sétima e oitava avaliação, o tratamento *Natrum muriaticum* e *Trichoderma* spp. resultou em maior crescimento em altura da *Melissa* com médias de

21,08, 22,73 e 24,65 cm planta⁻¹ respectivamente, menores médias foram observadas no tratamento controle. Na nona avaliação da altura, não houve diferença significativa nos tratamentos avaliados (Figura 3).

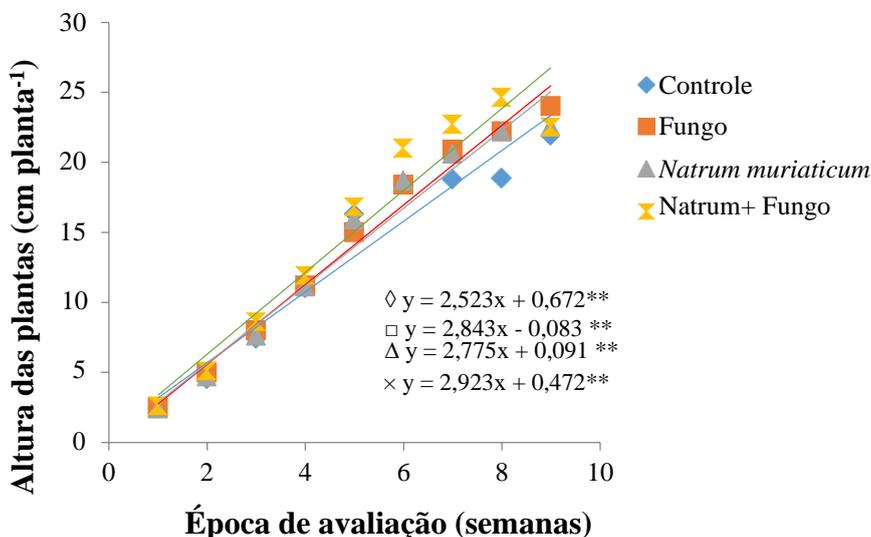


Figura 3: Avaliação de altura das plantas de *M. officinalis* dentro do intervalo de aplicação dos tratamentos, no segundo ciclo de produção.

Para massa fresca da parte aérea tanto a homeopatia utilizada individualmente quanto a homeopatia em conjunto com a inoculação (*Natrum muriaticum* e *Trichoderma* spp.) apresentaram maior acúmulo de massa, com média de 46,2 g planta⁻¹, enquanto que o controle apresentou menor rendimento com média de 40,7 g planta⁻¹ (Tabela 2).

Para a massa seca da parte aérea a homeopatia em conjunto com a inoculação, apresentou maior incremento da biomassa seca da planta de melissa com média de 12.7 g planta⁻¹, menor rendimento foi observado para o controle com 10,8 g planta⁻¹ (Tabela 2).

Tabela 2. Dados da massa fresca da parte aérea (MFPA) e massa seca da parte aérea (MSPA) e rendimento do óleo essencial (ROE) das plantas de *Melissa officinalis* L. submetidas ao tratamento homeopático *Natrum muraticum* e fungo *Trichoderma* spp. (TCS80) no segundo ciclo de produção.

Tratamento	MFPA (g)	MSPA (g)	ROE (%)
Homeopatia	45.8.a	11.2 b	0.60 a
Fungo	44.7 ab	11.0 b	0.38bc
Homeopatia +fungo	46.2 a	12.7 a	0.59b
Controle	40.7 b	10.8 b	0,34c
CV%	17.5	16.4	20.60
Média geral	253.7	31.63	0.0075

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

As plantas tratadas com homeopatia sem a inoculação tiveram um rendimento de 0,60% do óleo essencial. Enquanto as plantas tratadas com homeopatia e inoculadas com *Trichoderma spp.*, apresentaram um rendimento de 0,59%. Menor rendimento foi observado no controle com 0,34% do óleo essencial (Tabela 2).

DISCUSSÃO

A interação entre o medicamento homeopático *Natrum muriaticum* e a inoculação com o *Trichoderma*, apresentaram maior crescimento em altura das plantas. A promoção do desenvolvimento de plantas inoculadas com o *Trichoderma* pode estar relacionada, ao estímulo a multiplicação celular, através do aumento da disponibilidade e absorção de nutrientes pela planta, e à produção de hormônios (LUCON, 2009; MACHADO *et al.*, 2012).

Plantas que receberam a aplicação do *N. muriaticum* e a inoculação apresentaram maior incremento na produção de massa fresca (Tabela 3), esse ganho pode ser resultante da intensificação da fotossíntese no qual altera os mecanismos fisiológicos do vegetal através de acúmulo de massa, além do fornecimento de nutrientes (BONATO; PROENÇA; REIS, 2009).

Para MSPA não foi observado efeito significativo entre os tratamentos avaliados na primeira aplicação dos tratamentos (Tabela 3). Tal resultado pode estar relacionado a dinamização utilizada no presente estudo, não sendo favorável para o acúmulo de biomassa da planta de *Melissa officinalis* L. A aplicação de *Natrum muriaticum* estimulou o rendimento do óleo essencial das plantas de *Melissa*, independente da presença ou ausência de inoculante, o que indica seu potencial em influenciar no metabolismo secundário das plantas. Resultados diferentes a esse estudo foi verificado, em mudas de picão-preto (*Bidens pilosa* L.), tratadas com *Natrum muriaticum* na dinamização 3 CH, que houve resultado insignificativo na produção de óleo essencial e a atividade enzimática de catalase/peroxidase (ARMOND, 2003).

Os fungos do gênero *Trichoderma spp.*, são promotores do crescimento em espécies vegetais (MACHADO *et al.*, 2012), e uma rica fonte de metabólitos secundários (MUKHERJEE *et al.*, 2012), apresentam capacidade de produzir antibióticos e enzimas, e pela produção metabólica aos hormônios vegetais (CARVAJAL *et al.*, 2009), esses fatores podem ter contribuído para o rendimento do óleo essencial da *Melissa officinalis* L. Resultado positivo também foi verificado em

plantas de carquejo, que apresentou maior produção de quercetina, quando tratadas com *Silicea* na dinamização 6CH (CAPRA, 2011).

Os fungos podem colonizar folhas, ramos e raízes das plantas sem lhe causar danos, estabelecendo uma relação simbiótica no qual desempenham funções relevantes, bem como sanidade vegetal, crescimento, resistência a estresses, além de produzir compostos químicos como enzimas, alcalóides, hormônios e antibióticos (PEIXOTO NETO *et al.*, 2002).

Na segunda etapa do experimento, as plantas que receberam a aplicação do medicamento e a inoculação de forma individual ou em conjunto, apresentaram maiores incrementos na MFPA que as plantas tratadas com o tratamento controle. Enquanto que, maior MSPA foram verificadas em plantas que receberam a aplicação do *N. muriaticum* e a inoculação com *Trichoderma* (Tabela 2). Infere-se que a inoculação em conjunto com *N. muriaticum* pode ter contribuído para o crescimento radicular das plantas de *M. officinalis* L. no qual possibilita uma maior absorção de nutrientes e conseqüentemente favorece o aumento do crescimento e produtividade (BAYOUMI *et al.*, 2019).

Plantas tratadas com homeopatia sem a inoculação tiveram um rendimento de 0,60% do óleo essencial. Enquanto as plantas tratadas com homeopatia e inoculadas com *Trichoderma* spp., apresentaram um rendimento de 0,59%. Ambos os tratamentos, apresentaram maior média quando comparados ao controle. O uso individual do *Natrum muriaticum* influenciou significativamente no rendimento do óleo essencial tanto na primeira quanto na segunda aplicação, tal fator pode estar relacionada às características do medicamento homeopático em atuar na regulação da perda de líquidos e consumo de água em planta (TICHAVSKÝ, 2009). A aplicação da homeopatia atua no metabolismo vegetal, podendo aumentar ou diminuir compostos bioativos (Duarte, 2003), o que pode explicar a sua influência no rendimento de óleo essencial.

A influência tanto do *Natrum muriaticum*, quanto da inoculação do *Trichoderma* no metabolismo secundário da *Melissa*, tornam as plantas mais resistentes a fatores ambientais, bem como, temperatura, intensidade de luz, conteúdo de água e deficiência nutricional, potencializando o rendimento de óleo essenciais. O aumento do teor de óleo essencial estimulado pela aplicação da homeopatia possibilita o uso da *Melissa* como fonte de matéria prima destinada a indústria farmacêutica e ao controle de fitopatógeno no setor agrícola.

Até o presente momento, não há estudos referentes a influência do *Trichoderma* na produção e rendimento do óleo essencial de *Melissa officinalis* L.

CONCLUSÃO

O medicamento homeopático *Natrum muriaticum* 5CH e a inoculação com *Trichoderma* promoveu aumento da produtividade de *Melissa officinalis* L e rendimento de óleo essencial da espécie.

A aplicação do medicamento homeopático *Natrum muriaticum* 5CH influenciou no rendimento de 0,60% do óleo essencial de *Melissa officinalis* L.

REFERÊNCIA

ALBUQUERQUE, U. P. **Catálogo de plantas medicinais da Caatinga: guia para ações de extensão.** Bauru, SP: canal 6, 68.-2010.

ALMEIDA, C. C. O. F; SANTOS, J. S. **Das plantas medicinais à fitoterapia: uma ciência em expansão.** Brasília: IFB, 2016. 214 p.

AMARAL, F.; BARROS, M. B. **AROMATERAPIA.** 1 ed. São Paulo. Caras S.A, 2004. 48p.

BAE, S. J.; MOHANTA, T. K.; CHUNG, J. Y.; RYU, M.; PARK, G.; SHIM, S.; HONG, S. B.; SEO, H., BAE, D. W.; BAE, I.; KIM, J. J.; BAE, H. *Trichoderma* metabolites as biological control agents against *Phytophthora pathogens*. **Biological control**, v.92, p.128-138, 2016.

BAYOUMIA, Y.; TAHAB, N; SHALABYA, C, T.; ALSHAALD, E. T.; EL-RAMADYD, H. *Sulfur* promotes biocontrol of purple blotch disease via *Trichoderma* spp. and enhances the growth, yield and quality of onion. **Applied Soil Ecology**, [S.L], v. 134, p. 15-24, 2019.

BONATO, C. M.; PROENCA, G. T. de; REIS, Bruno. Os medicamentos homeopáticos *Sulphur* e *Arsenicum album* afetam o crescimento e o teor de óleo essencial em menta (*Mentha arvensis* L.). **Acta Sci., Agron.**, v. 31, n. 1, p. 101-105, 2009.

BRACCINI, G. L., CASETTA, J., DA SILVA, S. C. C., DE OLIVEIRA CARNIATTO, C. H., DOS SANTOS, V. D. R., & COSTA, V. F. Aplicação da Homeopatia na Produção Animal. **Revista Valore**, Volta Redonda, SP. ed 4. p. 310-323, 2019.

BRASIL. **Instrução Normativa N°007 de 17 de maio de 1999.** Estabelece normas para produção de produtos orgânicos vegetais e animais. Diário Oficial da União, Brasília, n094, Seção 1, p. 11, 19 de Maio de 1999.

CHAVSKÝ, R. **Homeopatía para las plantas**. Monterrey, Nuevo Leon: Fujimoto, Centro Universitario Comenius, 2009. 236p.

CONSTANTINO, H. S.; AUGUSTO, L. A.; VIZÚ, J. F.; GOMES, T. M.; ROSSI, F. **Germinação de sementes de fisális (*Physalis peruviana* L.) submetidas a preparados homeopáticos**. In: XI Congresso Latino-americano de Agroecologia; X Congresso Brasileiro de Agroecologia; V Seminário de Agroecologia do Distrito Federal e Entorno, 2017, Brasília. Anais... Brasília: Associação Brasileira de Agroecologia, v. 13, n. 1, p.7-11, 2017.

DIAS, M. I, BARROS L, SOUSA M.J, FERREIRA I. C. F. R. Nutracêuticos e potencial antioxidante de erva-cidreira: amostras cultivadas, obtidas por cultura in vitro e comerciais. **Anais...11º Encontro Nacional de Química dos Alimentos**, 16 a 19 de setembro de 2012, 2012.

DUARTE, E. S. M. **Soluções homeopáticas, crescimento e produção de compostos bioativos em *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae)**. Viçosa: UFV, 2003. 92p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2003.

GRAMS, N. Homeopathy—where is the science? **EMBO reports**, [S.L], v. 20, n. 3, 2019. DOI: <https://doi.org/10.15252/embr.201947761>. Acessado em: 16 de dezembro de 2019.

LOUZADA, G. A. S., CARVALHO, D. D. C., MELLO, S. C. M., LOBO JÚNIOR, M., MARTINS, I.; BRAÚNA, L. M. Antagonist potential of *Trichoderma* spp. from distinct agricultural ecosystems against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Fusarium solani*. **Biota Neotropica**, v.9, n.3, p.145-149, 2009.

LUCON, C. M. M. Promoção de crescimento de plantas com o uso de *Trichoderma* spp. (em linha). Infobibos, **Informações Tecnológicas**, 2009.

LUCON, C. M. M. Promoção de crescimento de plantas com o uso de *Trichoderma* spp. (em linha). Infobibos, **Informações Tecnológicas**, 2009.

MACHADO, D. F. M; PARZIAMELL, F. R.; ANTONIOLLI, A. C. F. S; ZAIDA, I. *Trichoderma* no Brasil: o fungo e o bioagente. **Revista de Ciências Agrárias**, v.35, n.1, 2012.

MACHADO, D.F.M. e SILVA, A.C.F.da. *Trichoderma* no controle in vitro de fungos presentes em diásporos de *Gochnatia polymorpha*. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 36, p. 07-09, 2013.

MACHADO, D.F.M.; SILVA, A.C.F. *Trichoderma* no controle in vitro de fungos presentes em diásporos de *Gochnatia polymorpha*. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 36, p. 07-09, 2013.

MARTINS, D. V; SANTOS, L. D; CRUZ, M. C. P. homeopatia no ensino de química para o conceito de diluição extrema numa abordagem ciência, tecnologia e sociedade. **Revista de Educação, Ciências e Matemática**, v. 5, n. 2, 2015.

MASCANHERAS, M.S. **Controle do mal-do-panamá com *Trichoderma* spp. e diferentes matéria orgânica**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2016.

MORAIS, L. A. S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. In: Embrapa Meio Ambiente-Artigo em anais de congresso (ALICE). Horticultura Brasileira, Brasília, DF, v. 27, n. 2, p. S3299-S3302, ago. 2009. CD-ROM. Suplemento. Trabalho apresentado no 49. **Congresso Brasileiro de Olericultura**, Águas de Lindóia, SP., 2009.

PAIVA, LUCIANA HELENA COSTA. **Os quatro pilares da homeopatia**. Monografia Apresentada ao curso de especialistas em homeopatia para farmacêuticos do instituto hamaniano do Brasil. Rio de Janeiro, 1998.

PINHEIRO, R. A.; DUARTE, V. C. B.; BEVILAQUA, G. A. P.; ANTUNES, I. F. Efeito de Preparados Homeopáticos no Vigor de Sementes e Desenvolvimento de Plântulas de Feijão. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 42, n. 2, p. 81-90, 2019.

PULIDO, E. High dilution preparations for organic production system of broccoli. *Agronomia Colombiana*, [S. L], n. 36, ed. 1, p. 53-68, 2017.

R Core Team (2018). R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria**. URL <https://www.R-project.org/>.

SILVA, F. A; SILVA, S.C; SILVEIRA, N. B.; ANTONUCCI, J. P; MOREIRA, M.; FRANCO, A. J; Avaliação do nível de conhecimento e interesse em homeopatia entre os estudantes dos primeiros períodos da faculdade de ciências biológicas e da saúde. **ANAIS SIMPAC**, v. 3, n. 1, 2015.

SILVA, G. F; MAPELI, C.N; CREMON, C; MANDARINO, A. P.; CARDOSO, S.; Wesley P.; Resposta morfológica de plantas de boldo (*Plectranthus barbatus*) submetidas a diferentes soluções homeopáticas. **Cadernos de Agroecologia**, v. 10, n. 3, 2016.

SILVA, T. G. SILVA, P. S. C. **Estudo da composição elementar de *Melissa officinalis* de diferentes procedências por análise por ativação neutrônica**, 2011.

SIQUEIRA, T. J; LENS, M. M; SILVA, G. H. Estudo piloto da influência de *Natrum muriaticum* 6CH e 30CH numa cultura padronizada de *Phaseolus vulgaris* L. **Revista de Homeopatia**, [S.L], v. 73, n.1\2, p. 68-76, 2010.

SOUZA, L.S.S. **Uso de *Trichoderma* spp. e materiais orgânicos como estratégias para o controle do mal-do-panamá.** 2016. 162 f. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Bahia, 2016.

TEXEIRA, M. Z. Fundamentação científica do princípio de cura homeopático na farmacologia moderna. **Revista de homeopatia**, [S.L.], v.80, n.1, p. 40-88, 2017.

CAPÍTULO II

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Melissa officinallis* L. SOB O FUNGO *Aspergillus welwitschiae*

INTRODUÇÃO

Os óleos essenciais (OEs) são determinados como substâncias complexas voláteis, lipofílicas, frequentemente odoríferas e líquidas, resultante do metabolismo secundário de vegetais (MILLEZI *et al.*, 2013). Os componentes dos óleos essenciais são derivados terpênicos, como os monos e sesquiterpenos e os fenilpropanóides (MIRANDA *et al.*, 2016).

Estudos têm apontado que os extratos vegetais e os óleos essenciais de plantas apresentam potencial para o controle alternativo de diversas doenças (BRUM, 2012, PEIXINHO *et al.*, 2017, ARAÚJO e TEBALDI, 2019). Os óleos essenciais extraídos de plantas manifestam atividade antimicrobiana frente a numerosos microrganismos, sendo considerados como alternativa conservação de alimentos (POMBO *et al.*, 2018).

A importância fitoterápica e, assim sendo, econômica da *Melissa officinallis* L. tem colaborado para expansão do seu cultivo (SANTOS *et al.*, 2009). Os rendimentos em óleo essencial de *M. officinallis* L., alcançados por hidrodestilação, são frequentemente muito baixos (0,02 a 0,40%) e sendo, assim, exibindo a uma das classes

mais preciosas de óleo essencial, expondo alto preço, comparado aos preços do óleo essencial de rosas e de flor de laranjeira (SORENSEN, 2000).

Os fungos filamentosos compõem o maior grupo microbiano com diferentes espécies e exibe uma gama de variedade no que refere à morfologia, fisiologia e aspectos bioquímicos (FARINAS; BARBOSA, 2012). O gênero *Aspergillus* atinge várias áreas de pesquisa, pois eles têm uma boa adaptação para crescer em uma faixa ampla de temperatura, os fungos deste gênero possuem esporos resistentes à luz e a substâncias químicas, sendo assim conseguem competir com outros gêneros e apresentam difícil controle (VON HERTWIG, 2015).

Portanto objetivou-se verificar o potencial antimicrobiano do óleo essencial de plantas de *Melissa officinalis* L. sob o fungo *Aspergillus welwitschiae*.

METODOLOGIA

Este experimento foi desenvolvido no laboratório de Fitoquímica na Universidade Federal do Recôncavo da Bahia que está localizada no município de Cruz das Almas. Para tanto foi utilizado óleo essencial de *Melissa officinalis* L. As plantas de *M. ofcinallis* L. foram cultivadas em casa de vegetação localizada na Fazenda Experimental da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB).

Os tratamentos foram constituídos dos medicamentos homeopáticos e fungo *Trichoderma asperellum* (TCS 81): T1: *Natrum muriaticum* 5CH + TCS81; T2: *Natrum muriaticums* 5CH; T3: TCS 81 e o controle (água).

Os substratos utilizados no cultivo das mudas foram: solo autoclavado, esterco bovino curtido (proporção 3:1) e palha de bananeira triturada (10 g). Para o plantio que se deu por semeadura direta as mudas foram colocadas em sacos de polietileno com capacidade para 2 kg. As plantas receberam aplicações do medicamento homeopático *Natrum muriaticum* 5CH (Diluição em unidades centesimais) a cada 7 dias e inoculações com fungo do gênero *Trichoderma* a cada 30 dias e as plantas controle receberam apenas água destilada. As mudas foram regadas 3 vezes ao dia, durante 10 minutos por meio de sprinklers existentes na casa de vegetação.

O medicamento homeopático utilizado foi preparado de acordo com as normas descritas na Farmacopéia Homeopática Brasileira (2011). O medicamento *Natrum muriaticum* 5 CH foi aplicado no substrato com auxílio de um copo do tipo Becker com capacidade de 100 mL a mesma quantidade utilizada durante as aplicações. Para a

inoculação do isolado de *Trichoderma asperellum* (TCS81), foi utilizado um micropipetador onde foram pipetados 5000 µL da solução de esporos ajustada a concentração de 10⁶ esporos / mL. A inoculação foi realizada diretamente no substrato utilizado.

Com 120 dias após o plantio foi realizada a colheita das plantas e a massa fresca foi submetida a secagem em estufa de circulação forçada, a 30 °C até obter massa constante. Para cada tratamento foram obtidas 4 repetições de óleo essencial totalizando 16 unidades experimentais, o óleo essencial foi extraído através da técnica de hidrodestilação, por arraste a vapor, em aparelho do tipo Clevenger de acordo com a metodologia de Santos et al., (2004) e para tal foram utilizadas a massa seca da parte aérea das plantas.

Após a extração, o óleo essencial foi armazenado em vasos de vidro com capacidade de 1mL, hermeticamente fechados e armazenados em freezer ao abrigo da luz para posterior análise. Devido à baixa quantidade de óleo essencial por repetição, as repetições de cada tratamento foram acondicionadas em um único vaso, obtendo-se 3 tratamentos e 1 controle. Esse material foi utilizado para a verificação do potencial antimicrobiano, as amostras do óleo essencial de *M. officinalis* L. foram avaliadas através do teste de concentração mínima inibitória, sob efeito no fungo *Aspergillus welwitschiae*

Determinação do Potencial Antimicrobiano

Obtenção dos Isolados:

O isolado de *Aspergillus welwitschiae* foi obtido da coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia Agrícola do CCAAB/UFRB. Cada isolado foi repicado em placas de Petri contendo meio de cultivo batata dextrose ágar (BDA), e mantido por 7 dias à temperatura de ± 28°C para crescimento da colônia e posterior utilização nos ensaios.

Ensaio Antifúngico

Concentração Inibitória Mínima (MIC)

A princípio foi preparada a solução matriz do óleo essencial na concentração de 320 mg/µl diluído em Tween 20 (10%), para cada um dos tratamentos utilizados e o

controle, 40 mL da suspensão de esporos fúngicos na concentração de 10^6 conídios/ mL^{-1} , e como controle positivo ciclopirox de olamina 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em água destilada esterelizada.

Cada solução foi distribuída, em triplicata, na primeira fileira da placa de Elisa contendo 96 micropoços, com meio de cultivo batata-dextrose (BD), além do controle positivo, foi feito controle negativo, formado por meio BD, sendo realizadas 4 repetições da placa de titulação, com delineamento inteiramente ao acaso. A amostra do óleo essencial foi testada quanto à inibição do crescimento micelial dos isolados através das técnicas de microdiluição em caldo padronizadas pelo NCCLS (ELOFF 1998; KUSUCU *et al.*, 2004).

Antes de se iniciar as análises as placas de titulação foram purificadas, sendo lavadas em água corrente, imersas em solução de hipoclorito de sódio (NaClO) durante 20 minutos, e borrifadas com álcool etílico 70%, após secas foram esterilizadas em câmara de fluxo laminar, por 30 minutos sob luz ultravioleta. Após purificação das placas, foram adicionados 100 μl de meio BD a todos os micropoços, posteriormente foram adicionados 100 μl do óleo essencial nos 3 primeiros micropoços da linha. Seguidos de homogeneização e microdiluição seriada com o auxílio de micropipetas de alta precisão, nos três primeiros micropoços das linhas B, C, D e E, sendo estes 100 μl restantes, descartados.

Para os demais tratamentos foi utilizado o mesmo método supracitado, onde foi feita a diluição entre as demais linhas e colunas obedecendo mesmo padrão de triplicatas de acordo com os tratamentos utilizados nas plantas de *M. officinalis* L., para cada concentração testada de seu óleo essencial. Ao final foram inseridos 100 μl da solução fúngica, em todos os micropoços das placas de titulação, com exceção dos três primeiros micropoços das linhas F, G e H, pois correspondiam ao controle negativo do fungo. A concentração final do óleo e controle diluente foi de: 5,0; 2,5; 1,25; 0,625 e 0,312 ml/mL^{-1} (Figura 1). Tais concentrações foram selecionadas a partir de revisão bibliográfica e testadas em pré-testes.

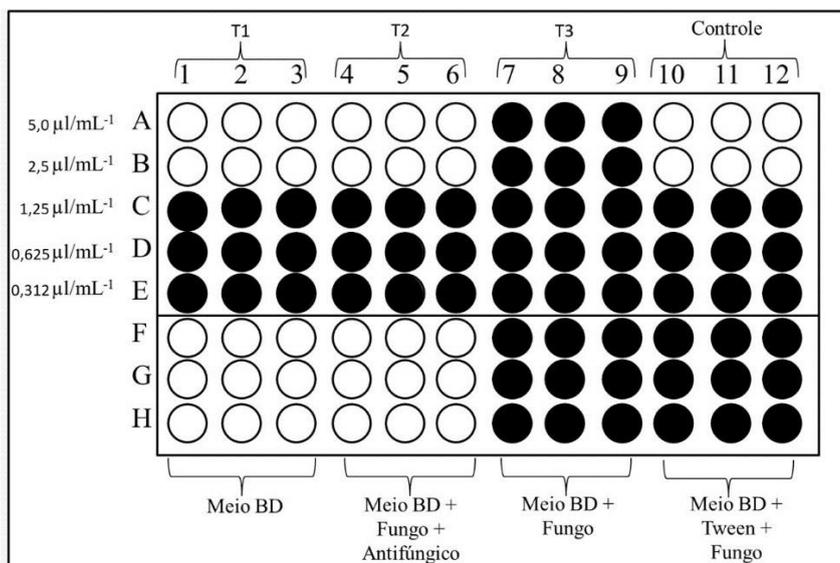


Figura 1: Disposição dos tratamentos na placa de Elisa contendo o meio de cultivo BD, preparada para o teste de concentração mínima inibitória.

Efeito Fungicida/Fungistático

O efeito fungicida/fungistático do óleo essencial de *M. officinallis* L. sob o fungo *A. welwitschiae*. Para tal as placas foram esterilizadas, lavadas e autoclavadas, após secas foram colocadas em câmara de fluxo laminar, por 10 minutos sob luz ultravioleta. Após esterilização as placas foram divididas em 4 quadrantes para avaliação da inibição do crescimento micelial do fungo, foram vertidos na placa meio batata dextrose ágar (BDA), esterilizado. Em seguida foram pipetados 100µL das amostras resultantes do teste de MIC (Mínima concentração inibitória) e adicionada uma gota em cada quadrante das placas de Petri. As placas foram vedadas com filme PVC e incubadas em estufa tipo B.O.D. por 72 horas a 28°C.

Análise dos Dados

Para o teste de concentração inibitória mínima (MIC), a análise foi realizada por meio da observação visual do crescimento do microrganismo nos micropoços das placas de Elisa comparando os resultados dos tratamentos ao controle positivo. Para análise do teste *in vitro* do efeito fungicida/fungistático do óleo essencial de *M. officinallis* L. sob o fungo *A. welwitschiae*, foi analisada a presença ou ausência do crescimento micelial do fungo nas placas de Petri.

RESULTADOS

O óleo essencial das plantas de *M. officinallis* L. tratadas a inoculação do *T. asperellum* (TCS81) apresentaram efeitos no crescimento micelial do fungo *A. welwitschiae*, concentração mínima inibitória de 2,5 e 5,0 $\mu\text{L}/\text{mL}^{-1}$ (Tabela 1).

Tabela 1. Resultados do teste de concentração mínima inibitória (MiC), do óleo essencial de *M. officinallis* L. tratados com *Natrum muriaticum* 5CH e inoculação de *T. asperellum* (TCS81), sob o fungo *A. welwitschiae*, Cruz das Almas/BA, 2019.

Concentrações (ml/mL^{-1})	T1	T2	T3	Controle
5,0	Não	Não	Crescimento	Não
2,5	Não	Não	Crescimento	Não
1,25	Crescimento	Crescimento	Crescimento	Crescimento
0,625	Crescimento	Crescimento	Crescimento	Crescimento
0,312	Crescimento	Crescimento	Crescimento	Crescimento

T1 (*Natrum muriaticum* 5CH + TCS81); T2 (*Natrum muriaticum*5CH); T3 (TCS81); Controle

Quanto ao potencial fungicida/fungistático testado no óleo essencial das plantas dos tratamentos 1 (*Natrum muriaticum* 5CH + TCS81), 2 (*Natrum muriaticum* 5CH) e o controle nas concentrações de 2,5 e 5,0 $\mu\text{L}/\text{mL}^{-1}$ o óleo essencial da *M. officinallis* L. O tratamento 2 apresentou-se como fungistático, pois ao ser inoculado em meio de cultura BDA houve crescimento micelial do fungo *A. welwitschiae*. No entanto para os tratamentos 1 e controle o óleo essencial apresentaram efeito fungicida, pois ao serem inoculados em meio BDA não ocorreu crescimento micelial (Figura 2).

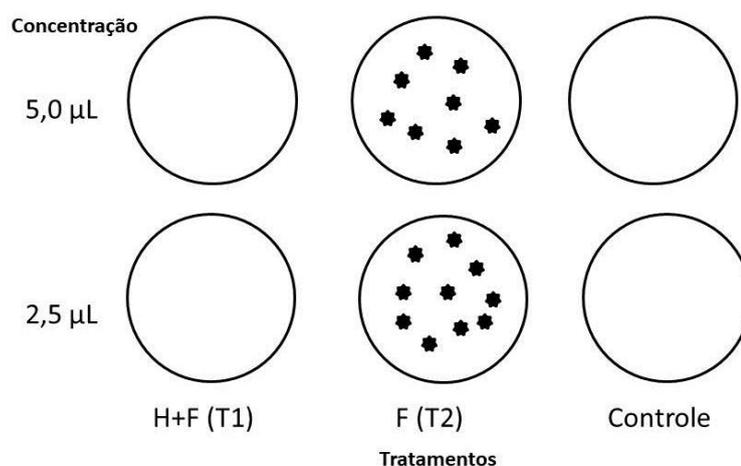


Figura 2: Crescimento micelial observado 72 horas após inoculação dos fungos na placa de Petri. Tratamento 1 (*Natrum muriaticum* 5CH + TCS81); Tratamento 2

(*Natrum muriaticum* 5CH) e controle nas concentrações de 5,0; 2,5 $\mu\text{L}/\text{mL}^{-1}$ de óleo essencial de *M. officinalis*.

DISCUSSÃO

O óleo essencial tem característica lipofílica que permite a sua atuação na estrutura da parede celular do microrganismo, desnaturando e coagulando proteínas, na atividade antimicrobiana, isso porque o óleo essencial altera a permeabilidade da membrana citoplasmática interrompendo os processos vitais da célula (GNATTA *et al.*, 2016).

O efeito do óleo essencial de *M. ofcinallis* L. é atribuído aos compostos bioativos que possuem, como o citral (SILVA *et al.*, 2017), na erva cidreira que são substâncias antimicrobianas, no qual inibiram o crescimento de *A. welwitschiae*, mostrando-se promissor no controle de fungo, reduzindo a severidade da doença. Demonstrando que, no presente estudo, que o uso do *N. muriaticum* e a inoculação com *Trichoderma*, potencializou o efeito fungitóxico do óleo essencial de *M. officinalis* L (Tabela 1).

Os óleos essenciais de citronela e menta foram mais eficientes em inibir o crescimento micelial de *L. theobromae*, com redução da doença em 30 e 29,2%, respectivamente (PEIXINHO *et al.*, 2017). Os óleos essenciais de cravo da índia (*Syzygium aromaticum*) e erva cidreira (*Melissa officinalis*), e o hidróxido de cobre, nas concentrações 100 e 10% inibiram o crescimento de *Xanthomonas* spp. *in vitro* e quando aplicados em intervalos de três e seis dias reduziram a severidade da mancha bacteriana do tomateiro, sendo eficientes no controle da doença (ARAÚJO e TEBALDI, 2019).

Os óleos essenciais podem ser utilizados principalmente na agricultura orgânica, onde utiliza-se produtos naturais para o controle de doenças, reduzindo o uso de defensivos agrícolas e conseqüentemente o impacto ambiental (ARAÚJO e TEBALDI, 2019).

A utilização do medicamento homeopático *Natrum muriaticum* 5CH em conjunto com o *Trichoderma*, possivelmente influenciou na composição química do óleo essencial da espécie supracitada uma vez que o tratamento com óleo essencial das plantas tratadas reduziu o crescimento micelial do fungo *A. welwitschiae*. Efeito de medicamento homeopático foi observado em planta medicinal *Ocimum gratissimum*,

com aumento do teor de óleo essencial e alteração na quantidade de compostos químicos do mesmo (SAMPAIO, 2019).

Algumas cepas de *Trichoderma* spp., podem estabelecer relação simbiótica com vegetais, em que coloniza as raízes e promove um maior desenvolvimento das plantas, além de induzir a resistência a doenças e tolerância ao estresse abiótico, através da alteração do metabolismo secundário dos vegetais (GOMES *et al.*, 2017).

Inferese através do resultado obtido no presente trabalho que, o fungo *Trichoderma* apresentou influência na síntese de produtos do metabolismo secundário das plantas de *M. officinalis*, uma vez que a utilização de fungos deste gênero tem sido relacionada a produção de hormônios, promoção de crescimento, disponibilização e aumento da absorção de nutrientes para plantas (MACHADO *et al.*, 2012).

CONCLUSÃO

Concluiu-se que o óleo essencial de *Melissa officinalis* L. promoveu a redução do crescimento micelial de *A. welwitschiae* e que o medicamento homeopático *Natrum muriaticum* 5CH e a inoculação com *Trichoderma asperellum*, influenciou na composição química do óleo essencial de plantas de *M. officinalis* L.

REFERENCIA

ARAÚJO, V. C.; TEBALDI, N. D. Intervalo de aplicação de óleos essenciais no controle da mancha bacteriana do tomateiro, **Summa phytopathol**, v. 45 n.2, 2019.

FARINAS, C. S.; BARBOZA, D. C. Fungos filamentosos de interesse em agroenergia: avaliação de diferentes metodologias de preservação do fungo *Aspergillus niger*. **Embrapa Instrumentação-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento** (INFOTECA-E), 2012.

GNATTA, J. R.; KUREBAYASHI, L. F. S; TURRINI, R. N. T; SILVA, M. J. P. Aromaterapia e enfermagem: concepção histórico-teórica. **Revista Escola Enfermagem.**, v. 50, n. 1, p. 127-133, 2016.

GOMES, E. V; ULHOA, C.J; CARDOZA, R. E; SILVA, R. N; GUTIÉRREZ, S. Involvement of *Trichoderma harzianum* Epl-1 Protein in the Regulation of Botrytis Virulence and Tomato Defense-Related Genes. **Front Plant Sci.** v. 8, n. 880, 2017.

MACHADO, D. F. M; PARZIANELLO, F. R; SILVA, A. C. F; ANTONIOLLI, Z. I. *Trichoderma* no Brasil: o fungo e o bioagente. **Revista de Ciências Agrárias**. [S.L], vol. 35, n. 1, p.274-288. 2012.

MILLEZI, A. F; BAPTISTA N. N.; CAIXETA D. S.; ROSSONI D. F.; CARDOSO M.G.; PICCOLI R.H. Caracterização e atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas condimentares e medicinais contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 3, p. 373-379, 2013.

MIRANDA, C. A. S. F; CARDOSO, M.G; BATISTA. R. L; RODRIGUES; L.M.A; FIGUEIREDO; A.C.S. Óleos essenciais de folhas de diversas espécies: propriedades antioxidantes e antibacterianas no crescimento espécies patogênicas. **Revista Ciência Agronômica**, v. 47, n. 1, p. 213-220, 2016.

PEIXINHO, G. S.; RIBEIRO, V. G. R.; AMORIM, E. P. R. Controle da Podridão seca (*Lasiodiplodia theobromae*) em cachos de videira cv. Itália por óleos essenciais e quitosana. **Summa phytopathol**, v. 43, n.1, 2017.

POMBO, J. C. P.; RIBEIRO, E. R.; LIMA PINTO, R.; SILVA, B. J. M. Efeito antimicrobiano e sinérgico de óleos essenciais sobre bactérias contaminantes de alimentos. **Segurança Alimentar e Nutricional**, 25, n, p. 108-117, 2018.

SAMPAIO, L. A. G. **Homeopatia na germinação, crescimento e produção de óleo essencial em *Ocimum gratissimum* L.** 2019. 80 p. Tese (Doutor em Produção Vegetal.) - Discente, Ilhéus- Ba, 2019.

SANTOS, M. D. F.; MENDONÇA, M. D. C.; CARVALHO FILHO, J. L. S. D.; DANTAS, I. B.; SILVA-MANN, R.; BLANK, A. F. Esterco bovino e biofertilizante no cultivo de erva-cidreira-verdadeira (*Melissa officinalis* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 4, p. 355-359, 2009.

SILVA, E. O.; ALVES, E.; FERREIRA, T. C.; ALBUQUERQUE, C. A. C. Óleos essenciais no controle da pinta bacteriana e na ativação de respostas bioquímicas em tomateiro. **Summa Phytopathologica**, v.43, n.3, p.212-217, 2017.

SORENSEN, Janina M. *Melissa officinalis*. **International Journal of Aromatherapy**, v. 10, n. 1-2, p. 7-15, 2000.

VON HERTWIG, A. M. "*Aspergillus* toxigênicos em café e cacau: incidência, produção de micotoxinas e discriminação molecular de espécies de *Aspergillus niger* por PCR em tempo real." (2015).

CONSIDERAÇÃO FINAIS

A utilização do medicamento homeopático *Natrum muriaticum* 5CH e a inoculação com o fungo *Trichoderma* promoveu maior produtividade das plantas de *Melissa officinalis* e rendimento de óleo essencial da espécie. O óleo essencial da *M. officinalis* L. possui potencial para redução do crescimento micelial de *A. welwitschiae*,

podendo inibir o crescimento do patógeno, atuando no controle da doença denominada podridão vermelha do sisal.

A utilização do medicamento homeopático e da inoculação do fungo *Trichoderma* em plantas medicinais consiste em uma estratégia importante na agricultura sustentável, por fornecer nutrientes as plantas e reduzir o uso de defensivos agrícolas, já que reduz o crescimento de fitopatógenos, através da produção de óleo essencial com potencial antifúngico. Dessa forma, estudos fitotécnicos em relação a influência desses tratamentos em plantas de *M. officinalis* L, são relevantes para obtenção de informações consistentes acerca dessa tecnologia.