

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON**

MÁRCIA ANTONIA BARTOLOMEU AGUSTINI

**ÓLEO ESSENCIAL DE *Moringa oleifera* Lam. NA MICROBIOTA
FITOPATOGÊNICA E POTENCIAL FISIOLÓGICO DE SEMENTES DE *Phaseolus
vulgaris* L.**

MARECHAL CÂNDIDO RONDON

2015

MÁRCIA ANTONIA BARTOLOMEU AGUSTINI

**ÓLEO ESSENCIAL DE *Moringa oleifera* Lam. NA MICROBIOTA
FITOPATOGÊNICA E POTENCIAL FISIOLÓGICO DE SEMENTES DE *Phaseolus
vulgaris* L.**

Tese apresentada à Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, para obtenção do título de Doctor Scientiae.

Orientadora: Prof. Dra. Marlene de Matos Malavasi.

Co-orientadores: Dr. José Renato Stangarlin.

Dr. Ubirajara Contro Malavasi.

MARECHAL CÂNDIDO RONDON

2015

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca da UNIOESTE - Campus de Marechal Cândido Rondon - PR., Brasil)

A284o	Agustini, Márcia Antonia Bartolomeu Óleo essencial de Moringa oleifera Lam. na microbiota fitopatogênica e potencial fisiológico de sementes de Phaseolus vulgaris L. / Márcia Antonia Bartolomeu Agustini. - Marechal Cândido Rondon, 2015. 84 p. Orientadora: Dr ^a Marlene Matos Malavasi Coorientador: Dr José Renato Stangarlin Dr. Ubirajara Contro Malavasi Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Marechal Cândido Rondon, 2015. 1. Feijão - Semente. 2. Sementes - Tratamento. 3. Moringa oleifera Lam. 4. Essências e óleos essenciais. I. Malavasi, Marlene Matos. II. Stangarlin, José Renato. III. Malavasi, Ubirajara Contro. IV. Título. CDD 22. ed. 635.652 634.97364 CIP-NBR 12899
-------	--

Ficha catalográfica elaborada por Marcia Elisa Sbaraini-Leitzke CRB-9/539

MÁRCIA ANTONIA BARTOLOMEU AGUSTINI

ÓLEO ESSENCIAL DE *Moringa oleifera* Lam. NA MICROBIOTA
FITOPATOGÊNICA E POTENCIAL FISIOLÓGICO DE SEMENTES DE
Phaseolus vulgaris L.

Tese apresentada à Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

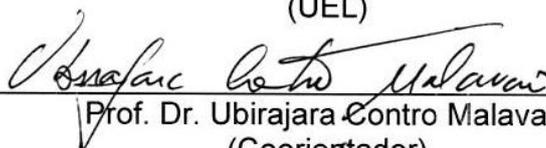
APROVADA: 10 de agosto de 2015



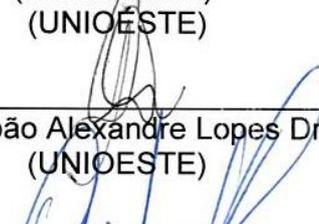
Prof. Dr. Robson Fernando Missio
(UFPR)



Prof. Dr. Claudemir Zucareli
(UEL)



Prof. Dr. Ubirajara Contro Malavasi
(Coorientador)
(UNIOESTE)



Pesq. Dr. João Alexandre Lopes Dranski
(UNIOESTE)



Prof. Dr. Odair José Kuhn
(UNIOESTE)



Prof.ª Dr.ª Marlene de Matos Malavasi
(Orientadora)
(UNIOESTE)

À Deus, meus pais Luiz e Maria, meu esposo Alexandre, amigos e orientadores pelo apoio, força, incentivo, companheirismo e amizade. Sem eles nada disso seria possível.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus e Nossa Senhora Aparecida, por sempre me concederem sabedoria nas escolhas dos melhores caminhos, coragem para acreditar, força para não desistir e proteção para me amparar.

Em especial, ao meu esposo Alexandre, pelo apoio incondicional, incentivo constante e amor dedicado durante esta etapa de minha formação acadêmica.

Aos meus pais Luiz Bartolomeu e Maria Rosalina Tozi Bartolomeu e demais familiares, pelo amor, confiança e motivação incondicional.

À Professora Marlene Malavasi, orientadora desta tese, por ter me acompanhado ao longo deste trabalho, e pela orientação. Mesmo sem me conhecer, você abriu as portas e acreditou na minha capacidade.

Aos meus co-orientadores José Renato Stangarlin e Ubirajara Contro Malavasi pelos ensinamentos e paciência durante toda esta trajetória, bem como, à todos os professores do Programa de Pós Graduação em Agronomia, cujos ensinamentos me conduziram.

Aos membros da banca avaliadora, por suas contribuições para o enriquecimento desta tese.

Às colegas Dangela Maria Fernandes, Leticia Wendt e Cristiane Paulus pela amizade e por tornarem mais suave e feliz esta caminhada.

A Universidade Estadual do Oeste do Paraná, em especial, ao Programa de Pós Graduação em Agronomia e ao grupo de pesquisa do Laboratório de Sementes e Mudas – LASEM, por oferecerem condições para minha aprendizagem.

À Universidade Federal de Lavras, em especial à Professora Heloisa de Oliveira e ao colega Rucyan Wallace Pereira pelo auxílio nos experimentos.

A Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Medianeira, em especial, aos colegas de trabalho (Graciela Leila Heep Viera, Ivonei Ottobelli, Juliana de Bortolli Mees) por ceder espaço físico para realização dos experimentos e ensinar a metodologia para extração do óleo essencial.

*“A mente que se abre a uma nova ideia
jamais voltará ao seu tamanho original.”*

(Albert Einstein)

RESUMO

AGUSTINI, M.A.B. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Agosto de 2015. **Óleo essencial de *Moringa oleifera* Lam. na microbiota fitopatogênica e potencial fisiológico de sementes de *Phaseolus vulgaris* L.** Orientadora: Marlene de Matos Malavasi. Co-orientadores: José Renato Stangarlin e Ubirajara Contro Malavasi.

Os óleos essenciais configuram como uma alternativa promissora para o tratamento de sementes. Neste contexto, este trabalho objetivou extrair e caracterizar o óleo essencial de *Moringa oleifera* (OEM), e avaliar seu efeito sobre a microbiota fitopatogênica e o potencial fisiológico de sementes de feijão. Para tanto, três experimentos foram conduzidos com o intuito de extrair e caracterizar o OEM, avaliar seu efeito sobre a viabilidade, o vigor a atividade de isoenzimas em sementes de feijão, e sobre fitopatógenos. A extração e caracterização do OEM ocorreu mediante hidrodestilação das folhas em Clevenger e da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Na avaliação da atividade antimicrobiana do OEM, utilizou-se seis tratamentos, sendo cinco doses de óleo essencial (0,0%; 0,1%; 0,2%; 0,4% e 0,8%) e um fungicida, na avaliação da germinação de esporos e da porcentagem de incidência de fungos (*blotter test*). As mesmas doses de OEM e um bactericida foram utilizados contra *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. Por sua vez, utilizou-se sete tratamentos (cinco doses de OEM, um fungicida e um bactericida) com oito repetições de cinquenta sementes distribuídos em DIC para avaliação do percentual de germinação, IVG e primeira contagem de germinação. Para os experimentos à campo, utilizou-se o DBC com 4 repetições de cinquenta sementes e avaliou-se a porcentagem de emergência e IVE. As enzimas esterase, álcool desidrogenase, superóxido dismutase e isocitrato liase foram investigadas por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida. Os efeitos das doses do óleo sobre a germinação de esporos fúngicos, o crescimento bacteriano e o potencial fisiológico das sementes foram avaliados por meio de equações de regressão e as médias dos tratamentos quantitativos (doses) foram comparadas aos tratamentos sintéticos por meio do teste de Dunnet ($P > 0,05$). Na composição química do óleo essencial foram identificados onze compostos, dentre os quais 12,92% são terpenos (linalol, timol e β -eudesmol) com propriedades antimicrobianas já referidas na literatura. O fungicida sintético pode ser substituído pela dose contendo 0,4% de OEM para a incidência de *A. flavus*, *Fusarium* sp. e *Alternaria* sp em sementes de feijão. Sobre a

germinação de esporos fúngicos, nenhuma das doses de OEM utilizadas foram estatisticamente iguais ao fungicida, no entanto, as doses crescentes reduziram a germinação de esporos de *Rhizopus* sp. e *Fusarium* sp. Apesar da redução no número de UFCs, as doses de OEM foram inferiores em eficiência se comparadas ao bactericida sintético na eliminação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. Para o potencial fisiológico, a dose com 0,8% de OEM reduziu a viabilidade e o vigor das sementes da cultivar Colibri e apresentou-se inferior ao bactericida e ao fungicida para o IVG e primeira contagem. Para Campos Gerais, a dose com 0,8% de OEM promoveu maiores médias para a germinação e mostrou-se superior ao bactericida para o percentual de germinação e primeira contagem. O ponto de máxima emergência e IVE foram obtidos com as doses 0,6% e 0,28% (Campos Gerais) e, 0,38% e 0,2% (Colibri). Os baixos valores de expressão de bandas para EST e ADH, relacionaram-se à maior germinabilidade das sementes e a maior expressão de SOD, associou-se à redução na germinação.

Palavras-chave: Tratamento de sementes. Vigor. Viabilidade. Terpenos. Antimicrobiano.

ABSTRACT

AGUSTINI, M.A.B. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, in August, 2015. **Essential oil of *Moringa oleifera* Lam. on the phytopathogenic microbiota and physiological potential of *Phaseolus vulgaris* L. seeds.** Advisor: Marlene de Matos Malavasi. Co-advisors: José Renato Stangarlin e Ubirajara Contro Malavasi.

The use of essential oils configures itself as a promising alternative for the treatment of seeds. In this context, this work aimed to evaluate the effect of the essential oil of *Moringa oleifera* (EOM) on the phytopathogenic microflora and the physiological potential of bean seeds. For this, three experiments were conducted in order to extract and characterize the EOM, to evaluate its effect on viability, vigor, isoenzyme activity in bean seeds, and on plant pathogens. The extraction and characterization of EOM occurred by hydrodistillation of the leaves in Clevenger and gas chromatography-mass spectrometry. In assessing the EOM antimicrobial activity, were used six treatments, five doses of essential oil (0,0%, 0,1%, 0,2%, 0,4% and 0,8%) and a fungicide, in evaluating the germination of spores and fungi incidence percentage (*blotter test*). The same doses of EOM and a bactericidal were used against *Xap*. In turn, used seven treatments (five doses EOM, a fungicide and bactericide) with eight repetitions of fifty seeds distributed in CRD for evaluation of the percentage of germination, GSI and first count. The esterase, alcohol dehydrogenase, isocitrate lyase, and superoxide dismutase were investigated by polyacrylamide gel electrophoresis. The effects of the oil levels on germination of fungal spores, bacterial growth and physiological potential of seeds were evaluated by regression equations and the mean quantitative treatment (dose) were compared to synthetic treatment by the Dunnet test ($P > 0,05$). In the essential oil composition, eleven compounds were identified, of which 12.92% was terpenes (linalool, thymol and β -eudesmol) with antimicrobial properties above mentioned in the literature. The synthetic fungicide may be substituted by dose containing 0.4% EOM for the incidence of *A. flavus*, *Fusarium* sp. and *Alternaria* sp. in bean seeds. On germination of fungal spores, none of the OEM doses used were statistically equal to fungicidal, however, increasing doses obtained linear effect on the germination of spores of *Rhizopus* sp. and *Fusarium* sp. Despite the reduction in the number of CFUs, the EOM doses were inferior to synthetic bacterial elimination *Xap*. For the physiological potential, the dose with 0,8% EOM reduced the viability and vigor of the

seeds of the cultivar Colibri and stood below the bactericide and fungicide for GSI and first count. For Campos Gerais, the dose with 0,8% EOM promoted germination and was superior to the bactericidal for the germination percentage and first count. The point of maximum emergence and GSI were obtained with doses of 0.6% and 0.28% (Campos Gerais), and 0,38% to 0,2% (Colibri). Low bands of expression values for EST and ADH, related to the higher germination of seeds and the greatest expression of SOD, was associated with reduction in germination.

Keywords: Seed treatment. Vigor. Viability. Terpenes. Antimicrobial.

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO 2

Figura 1. Inibição da germinação de esporos de <i>Rhizopus</i> sp., <i>Aspergillus flavus</i> e <i>Aspergillus niger</i> tratados com diferentes doses de óleo essencial de moringa (OEM).....	46
Figura 2. Inibição da germinação de esporos de <i>Aspergillus ochraceus</i> tratados com diferentes doses de óleo essencial de moringa (OEM).....	47
Figura 3. Inibição da germinação de esporos de <i>Fusarium</i> sp. tratados com diferentes doses de óleo essencial de moringa (OEM).....	49
Figura 4. Inibição da germinação de esporos de <i>Alternaria</i> sp. (A) e <i>Penicillium</i> sp. (B) tratados com diferentes doses de óleo essencial de moringa (OEM).....	48
Figura 5. Ajuste da curva de concentração bacteriana (em unidades formadoras de colônia – UFC) em função da absorbância a 580 nm.	51
Figura 6. Efeito das diferentes doses de óleo essencial de moringa (OEM) sobre a multiplicação de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	52

ARTIGO 3

Figura 1. Percentual de germinação de sementes de feijão das cultivares IPR Colibri (arco seno $\sqrt{x}/100$) e IPR Campos Gerais em função dos níveis de OEM.....	66
Figura 2. Índice de velocidade de germinação de sementes de feijão das cultivares IPR Colibri e IPR Campos Gerais em função dos níveis de OEM.....	68
Figura 3. Primeira contagem de germinação de sementes de feijão das cultivares IPR Colibri (A) ($\sqrt{x}+0,5$) e IPR Campos Gerais (B) em função dos níveis de OEM ...	69
Figura 4. Porcentagem de emergência de sementes de feijão das cultivares IPR Colibri (A) e IPR Campos Gerais (B) em função dos níveis de OEM.....	72
Figura 5. Índice de velocidade de emergência de sementes de feijão das cultivares IPR Colibri (A) e IPR Campos Gerais (B) em função dos níveis de OEM..	74
Figura 6. Perfil eletroforético revelado em gel de poliacrilamida para isoenzimas: esterase (A), isocitrato liase (B), álcool desidrogenase (C), e superóxido dismutase (D) extraídas de sementes de feijão das cultivares Campos Gerais e Colibri tratadas com fungicida, bactericida e diferentes doses (0; 0,1; 0,2; 0,4 e 0,8%) de óleo essencial de moringa... ..	77

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Tabela 1. Composição química do óleo essencial das folhas de <i>Moringa oleifera</i>	24
Tabela 2. Componentes do óleo extraído dos cotilédones do feijão	28

ARTIGO 2

Tabela 1. Incidência de fungos (%) e <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> (UFC/mL ⁻¹) em sementes de cultivares de feijão provenientes do estado do Paraná	42
Tabela 2. Porcentagem de incidência de fungos em sementes de feijão da cultivar Campos Gerais tratadas com óleo essencial de moringa (OEM).....	44
Tabela 3. Porcentagem de incidência de fungos em sementes de feijão da cultivar Colibri tratadas com óleo essencial de moringa (OEM).	45
Tabela 4. Porcentagem de germinação de esporos fúngicos tratados com óleo essencial de moringa(OEM).....	50
Tabela 5. Número de unidades formadoras de colônias (UFCs) em função do tratamento com diferentes doses de óleo essencial de moringa (OEM).	52

ARTIGO 3

Tabela 1. Médias para porcentagem de germinação, primeira contagem de germinação (%), tetrazólio e condutividade elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$) de sementes de feijão armazenadas, de acordo com as cultivares.....	64
Tabela 2. Médias para porcentagem de germinação, IVG e primeira contagem de germinação de sementes de feijão da cultivar IPR Campos Gerais tratadas com diferentes doses de OEM e fungicida.....	70
Tabela 3. Médias para porcentagem de germinação, IVG e primeira contagem de germinação de sementes de feijão da cultivar IPR Colibri tratadas com diferentes doses de OEM, fungicida e bactericida	71
Tabela 4. Médias para porcentagem de emergência e IVE I de sementes de feijão da cultivar IPR Colibri tratadas com diferentes doses de OEM, fungicida e bactericida	74
Tabela 5. Médias para porcentagem de emergência e IVE de sementes de feijão da cultivar IPR Campos Gerais tratadas com diferentes doses de OEM, fungicida e bactericida.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADH	Álcool desidrogenase
BOD	Biological Oxygen Demand
DBC	Delineamento em blocos casualizados
DIC	Delineamento inteiramente casualizado
EST	Esterase
IAPAR	Instituto Agronômico do Paraná
ICL	Isocitrato liase
ISTA	International Seed Testing Association
IVE	Índice de velocidade de emergência
IVG	Índice de velocidade de germinação
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
NIST	National Institute of Standards and Technology
OEM	Óleo essencial de moringa
R ²	Coeficiente de determinação
RAS	Regras para Análises de Sementes
S.O.D	Superóxido dismutase
U.R	Umidade relativa
UFC	Unidades formadoras de colônias
UFPA	Universidade Federal de Lavras
UNIOESTE	Universidade Estadual do Oeste do Paraná
USP	Universidade de São Paulo
UTFPR	Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Xap	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
REFERÊNCIAS	18
ARTIGO 1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E POTENCIAL DE DIFUSÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS DE <i>Moringa oleifera</i> (Lam): USO POTENCIAL NO TRATAMENTO DE SEMENTES	19
1 INTRODUÇÃO	20
2 MATERIAL E MÉTODOS	21
2.1 EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE MORINGA	21
2.2 CAPACIDADE DE DIFUSÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE MORINGA	23
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
3.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE MORINGA	24
3.2 CAPACIDADE DE DIFUSÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE MORINGA	28
4 CONCLUSÕES	28
REFERÊNCIAS	29
ARTIGO 2 CONTROLE DE FUNGOS DE ARMAZENAMENTO E <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> L. EM SEMENTES DE <i>Phaseolus vulgaris</i> L. TRATADAS COM ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Moringa oleifera</i> Lam	34
1 INTRODUÇÃO	35
2 MATERIAL E MÉTODOS	37
2.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E PROCEDIMENTOS ESTATÍSTICOS	37
2.2 QUALIDADE SANITÁRIA DAS CULTIVARES.....	38
2.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE MORINGA EM SEMENTES TRATADAS.....	39
2.4 AVALIAÇÃO IN VITRO DA ATIVIDADE FUNGICIDA DO ÓLEO ESSENCIAL DE MORINGA	40
2.5 AVALIAÇÃO IN VITRO DA ATIVIDADE BACTERICIDA DO ÓLEO ESSENCIAL DE MORINGA	41
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
3.1 QUALIDADE SANITÁRIA DAS CULTIVARES	42
3.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE MORINGA EM SEMENTES TRATADAS	43

3.3 AVALIAÇÃO IN VITRO DA ATIVIDADE FUNGICIDA DO ÓLEO ESSENCIAL DE MORINGA	45
3.4 AVALIAÇÃO IN VITRO DA ATIVIDADE BACTERICIDA DO ÓLEO ESSENCIAL DE MORINGA	51
4 CONCLUSÕES	53
REFERÊNCIAS.....	53
ARTIGO 3 DESEMPENHO FISIOLÓGICO E PADRÃO ELETROFORÉTICO DE ISOENZIMAS EM SEMENTES DE <i>Phaseolus vulgaris</i> L. TRATADAS COM ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Moringa oleífera</i> Lam.....	57
1 INTRODUÇÃO	58
2 MATERIAL E MÉTODOS	60
2.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E PROCEDIMENTOS ESTATÍSTICOS.....	60
2.2 POTENCIAL FISIOLÓGICO DAS CULTIVARES DE FEIJÃO.....	61
2.3 TRATAMENTO DAS SEMENTES DE FEIJÃO COM ÓLEO ESSENCIAL DE MORINGA	62
2.4 VIABILIDADE E VIGOR DAS SEMENTES APÓS O TRATAMENTO COM ÓLEO ESSENCIAL	63
2.5 ELETROFORESE DE ISOENZIMAS	62
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	64
3.1 POTENCIAL FISIOLÓGICO DAS CULTIVARES DE FEIJÃO	64
3.2 GERMINAÇÃO E VIGOR DAS SEMENTES TRATADAS COM ÓLEO ESSENCIAL	65
3.3 ELETROFORESE DE ISOENZIMAS	76
4 CONCLUSÕES	80
REFERÊNCIAS.....	80
CONCLUSÕES GERAIS	85

1 INTRODUÇÃO

No Paraná, a cultura do feijoeiro sempre teve um papel importante para a economia do estado, como geradora de emprego e renda no campo. Considerada uma cultura de subsistência em pequenas propriedades, é adotado também em sistemas intensivos de produção que requerem o uso de tecnologias como a irrigação, o controle fitossanitário e colheita mecanizada (SEAB, 2015).

Um fator fundamental para melhorar a produtividade da cultura do feijoeiro, é a utilização de sementes de boa qualidade, tendo em vista que uso de sementes com elevado potencial fisiológico e qualidade sanitária são de suma importância para obtenção de estande uniforme e rápido estabelecimento da cultura (ALMEIDA et al., 2013).

No tratamento de sementes, os produtos químicos são recomendados pela pesquisa com eficiência comprovada no controle de patógenos, reduzindo as falhas no estabelecimento do estande de plantas. Entretanto, os fungicidas e bactericidas atualmente disponíveis para o tratamento de sementes tem apresentado grandes problemas de contaminação ambiental e humana, além do fato de que maioria dos produtos para tratamento de sementes são sintéticos, o que impede a utilização no setor orgânico.

Assim, aliados a conscientização ecológica globalizada, tem se destacado as pesquisas com alternativas de controle natural relacionadas à preservação da fauna benéfica e dos inimigos naturais (MIGLIORINI et al., 2012).

De acordo com Fernandes Neto e Sarcinelli (2009), a maioria dos contaminantes químicos presentes em águas subterrâneas e superficiais está relacionada às fontes agrícolas e, os agrotóxicos assumem um lugar de destaque devido à intensidade de seu consumo no Brasil. Assim sendo, sistemas de cultivo mais sustentáveis e menos dependentes do uso de agrotóxico têm sido desenvolvidos com esta finalidade, especialmente no tocante à utilização de extratos e os óleos essenciais de plantas medicinais, condimentares e aromáticas que apresentam potencial para o manejo de doenças de plantas, não comprometendo o potencial fisiológico das sementes.

A busca por extratos e óleos essenciais provenientes de plantas com propriedades fungicidas e bactericidas para controlar a microflora fitopatogênica associada às sementes, além de ser uma alternativa de interesse econômico e

ecológico bastante viável, podendo ser utilizada na agricultura orgânica, ainda objetiva sustentabilidade ecológica, emprego de métodos biológicos em contraposição ao uso dos sintéticos e proteção ao meio ambiente.

Dentre os vegetais com potencial antimicrobiano, destaca-se a *Moringa oleifera*. Estudos demonstraram eficiência de seu extrato metanólico sobre o crescimento micelial de *Fusarium oxysporum*, *Cladosporim sphaerospermum* e *Colletotrichum lindemuthianum* (SILVA et al., 2009). Há também, de acordo com Donli e Dauda (2003), redução na incidência de *Mucor* sp, *Aspergillus niger*, *Rhizopus stolonifer* e *Aspergillus flavus* após utilização do extrato aquoso de moringa em sementes de amendoim (*Arachis hypogea*) nas concentrações de 5, 10, 15 e 20 g L⁻¹.

Para a inibição do crescimento bacteriano, a moringa apresentou resultados positivos com *Xanthomonas oryzae*, quando testada em diferentes concentrações sobre o crescimento de microrganismos patogênicos do arroz (SHEHU et al., 2013).

Muitos óleos essenciais e extratos vegetais têm comprovada atividade antimicrobiana contra fitopatógenos, no entanto, também podem apresentar atividade alelopática se utilizados como antimicrobianos no substrato de germinação ou no tratamento das sementes (GARCIA et al., 2012). Assim, para ser eficiente na eliminação de patógenos veiculados pela semente, o óleo essencial deve apresentar efeito tóxico aos micro-organismos fitopatogênicos e, não interferir negativamente no potencial fisiológico das sementes, determinados através de testes de germinação e vigor.

Enzimas envolvidas na germinação e deterioração das sementes (amilase, esterase, glicose-6-fosfato desidrogenase, superóxido-dismutase, peroxidase e catalase) também podem ser utilizadas como indicadores da qualidade fisiológica (MUNIZ et al., 2007). No entanto, não é conhecida a atividade destas enzimas nas sementes de feijão, tratadas com óleo essencial de *Moringa*, havendo, assim, a necessidade de estudos dessa natureza.

Este trabalho, portanto, objetivou extrair e caracterizar o óleo essencial de folhas de *Moringa oleifera*, bem como avaliar o efeito de diferentes doses sobre fungos de armazenamento e *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e sobre o potencial fisiológico de sementes de feijão das cultivares IPR Colibri e IPR Campos Gerais.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, A.P.V.; SILVA, E.S.; SILVA, V.P.; ZAGO, B.W.; OLIVEIRA, B.S. Qualidade física, fisiológica e sanitária de sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L) provenientes do município de Tangará da Serra – MT. **Centro Científico Conhecer**, v.9, n.17, p.2241-2249, 2013.

DONLI, P.; DAUDA, H. Valuation of aqueous Moringa seed extract as a seed treatment biofungicide for groundnuts. **Pest Management Science**, v.59, n.9, p.1060-1062, 2003.

FERNANDES NETO, M.; SARCINELLI, P.N. Agrotóxicos em água para consumo humano: uma abordagem de avaliação de risco e contribuição ao processo de atualização da legislação brasileira. **Revista Engenharia Sanitária e Ambiental**, v.14, n.1, p. 69-78, 2009.

GARCIA, R.A.; JULIATTI, F.C.; BARBOSA, K.A.G.; CASSEMIRO, T.A. Atividade antifúngica de óleo e extratos vegetais sobre *Sclerotinia sclerotiorum*. **Biocience Journal**, v.28, n.1, p.48-57, 2012.

MIGLIORINI, P.; KULCZYNSKI, S.T.; SILVA, T.A.; BELLÉ, C.; KOCH, F. Efeito do tratamento químico e biológico na qualidade fisiológica e sanitária de semente de canola. **Enciclopédia Biosfera**, v.8, n.15, p.788-801, 2012.

MUNIZ, F.R.; CARDOSO, M.G.; VON PINHO, E.V.R.; VILELA, M. Qualidade fisiológica de sementes de milho, feijão, soja e alface na presença de extrato de tiririca. **Revista Brasileira de Sementes**, v.29, n.2, p.195-204, 2007.

SECRETARIA DE ESTADO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO - SEAB. **Feijão: Análise da Conjuntura Agropecuária**, Outubro de 2013. Disponível em <http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/feijao_2012_13.pdf>. Acesso em 11 Jun 2015.

SHEHU, K.; ADDULLAHI, A.; ABIALA, M. A.; ODEBODE, A. C. In vitro bioprospecting of Botanicals towards inhibition of microbial pathogens of rice (*Oryza sativa* L.). **World Applied Sciences Journal**, v.22, n.2, p. 227-232, fev, 2013.

SILVA, R.A.C.; SOUZA, T.O.; DIAS, L.P.; ANDRADE, T.J.A.S. Ação do extrato metanólico da *Moringa oleifera* sobre o crescimento micelial de fitopatógenos. **In... IV CONGRESSO DE PESQUISA E INOVAÇÃO DA REDE NORTE E NORDESTE DE INOVAÇÃO TECNOLÓGICA**. Belém, PA, 2009.

ARTIGO 1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E POTENCIAL DE DIFUSÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS DE *Moringa oleifera* (Lam): USO POTENCIAL NO TRATAMENTO DE SEMENTES

Resumo: Tendo em vista o potencial de uso naturais com comportamento inibitório sobre fitopatógenos em sementes, este trabalho objetivou extrair e caracterizar o óleo essencial de folhas de *Moringa oleifera*, bem como, avaliar sua capacidade de difusão através dos tecidos das sementes de feijão tratadas com emulsão contendo o óleo essencial. A extração do óleo essencial ocorreu por meio de hidrodestilação das folhas de moringa em Clevenger e utilizando-se o solvente n-hexano para separação do hidrolato. Para avaliação da capacidade de difusão do óleo essencial, 400 sementes de feijão do grupo comercial carioca foram tratadas com emulsão (água destilada + Tween + 400 µl óleo essencial) e submetidas à hidrodestilação em Clevenger. A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas foi utilizada para caracterização dos componentes químicos do óleo essencial e, por meio de comparação dos espectros de massas, verificou-se os componentes do óleo essencial que se difundiram pelos cotilédones das sementes tratadas. Onze compostos químicos foram identificados. Dentre eles, hidrocarbonetos (87,08%) e terpenos (12,92%), dentre os quais figuram o linalol (1,28%), timol (2,49%) e β -eudesmol (9,15%) cujas propriedades antimicrobianas são citadas na literatura. Constatou-se ainda, que os monoterpenos e o sesquiterpeno foram encontrados no óleo obtido do cotilédone de sementes tratadas com o óleo essencial de moringa, evidenciando sua capacidade de se difundir pelos tecidos vegetais.

Palavras-chave: tratamento de sementes, linalol, β -eudesmol, timol.

ARTICLE 1 CHEMICAL CHARACTERIZATION AND POTENTIAL DIFFUSION OF ESSENTIAL OIL LEAVES FROM *Moringa oleifera* LEAVES: POTENTIAL USE IN SEED TREATMENT.

Abstract: In view of the potential use with natural with inhibitory behavior of pathogens in seeds, this study aimed to extract and characterize the essential oil of *Moringa oleifera* leaves, as well as, to evaluate its capability of diffusion through the tissues of bean seeds treated with emulsion containing the essential oil. The essential oil extraction was through hydrodistillation of moringa leaves in Clevenger and using the solvent n-hexane to separate the hidrolact. To evaluate the essential oil diffusion capacity, bean seeds of the Carioca commercial group were treated with emulsion (distilled water + Tween + 400 µl essential oil) and submitted to hydrodistillation in a Clevenger. Gas chromatography coupled with mass spectrometry were used to characterize the chemical components of the essential oil and by comparison of mass spectra, it was essential oil components which have diffused from the treated seed cotyledon. Eleven chemical compounds have been identified. Among them, hydrocarbons (87,08%) and terpenes (12,92%), among which include linalool (1,28%), thymol (2,49%) and β -eudesmol (9,15%) whose antimicrobial properties are described in the literature. It was found also that the

monoterpenes and sesquiterpene were found in the oil obtained from the seed cotyledon treated with the essential oil of moringa, showing its ability to diffuse through the plant tissue.

Keywords: seed treatment, linalool, β -eudesmol, thymol.

1 INTRODUÇÃO

As propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais, oriundos do metabolismo secundário das plantas têm sido reconhecidas empiricamente durante séculos, porém apenas recentemente foram confirmadas cientificamente. Deste modo, atualmente há diversas pesquisas envolvendo a atividade biológica de plantas medicinais originárias de diversas regiões do mundo, orientadas pelo uso popular destas espécies (DUARTE, 2006).

De acordo com Bakkali et al. (2008) os óleos essenciais são compostos complexos, naturais, voláteis e caracterizados por um forte odor. Podem ser sintetizados por todos os órgãos da planta, tais como flores, folhas, caules, galhos, sementes, frutas, raízes, madeira e cascas. Na natureza, eles desempenham um papel importante na proteção das plantas como antibacterianos, antivirais, antifúngicos e inseticidas.

A biossíntese de metabólitos secundários é um processo complexo e está sujeito à influência de fatores bióticos e abióticos que podem interferir na qualidade e quantidade de produtos secundários resultantes do metabolismo de uma planta em determinado momento (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). De acordo com Shi et al. (2006), dentre os principais fatores, pode-se citar: a temperatura, a sazonalidade, o ciclo circadiano, a disponibilidade de água, as lesões causadas por micro-organismos e injúrias decorrentes de fatores físicos.

Os componentes químicos dos óleos essenciais são divididos em duas grandes categorias: os derivados terpênicos, oriundos da via do ácido mevalônico-acetato ou do metileritritol 4-fosfato (CVEJIC; ROHMER, 2000) e os compostos aromáticos, oriundos da via do ácido chiquímico (fenilpropanóides) (GUENTHER, 1959). Destes, os terpenos figuram como os principais constituintes dos óleos essenciais, mas sua ocorrência se restringe a terpenos mais voláteis, como os monoterpenos (10 carbonos) e os sesquiterpenos (15 carbonos).

A diversidade da flora brasileira apresenta um imenso potencial para a produção de compostos secundários. Dessa forma, a busca constante de novos métodos de controle, como a utilização de novos princípios ativos, extraídos de plantas medicinais, silvestres e cultivadas, que possam ser utilizadas de forma integrada com os outros métodos, perfaz premissas importantes do Manejo Integrado de Pragas (MIP), reduzindo o impacto da utilização dos produtos químicos (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Originária do noroeste da Índia e conhecida com o nome vulgar de moringa, a *Moringa oleífera* Lamarck, pertencente à família das *Moringaceae* tem despertado interesse dos pesquisadores por suas propriedades antimicrobianas.

Para Barreto et al. (2009), o variado espectro de propriedades terapêuticas atribuídas à moringa tem motivado vários grupos de pesquisa a estudar esta espécie e, se tratando de óleo essencial, o mesmo pode ser ativo contra um amplo espectro de espécies de micro-organismos, porém as concentrações mínimas inibitórias podem variar (ANTUNES; CAVACOB, 2010).

A atividade antifúngica do óleo essencial extraído de folhas de moringa foi comprovada por Marrufo et al. (2013) que o testaram em diferentes concentrações em *Aspergillus niger* e *Penicillium citrinum*. Para fungos de solo, Moyo et al. (2012) encontraram resultados positivos ao testarem o extrato da moringa contra os gêneros *Rhizoctonia*, *Pythium* e *Fusarium*.

Tendo em vista a necessidade de se buscar por compostos naturais capazes de atuar como antimicrobianos, este trabalho objetivou extrair e caracterizar o óleo essencial de folhas de moringa, bem como, avaliar sua capacidade de difusão através dos tecidos cotiledonares, a fim de utilizá-lo como antimicrobiano no tratamento de sementes de feijão.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE MORINGA

A coleta das folhas de moringa foi realizada em dez matrizes localizadas em um viveiro de mudas localizado no município de Cascavel (PR), a 781 metros de altitude, 24° 57' 21" S de latitude, 53° 27' 19" W de longitude, no mês de Maio de 2014.

As árvores de moringa tinham idade aproximada de 2,5 anos e apresentavam flores e frutos no momento da coleta das folhas, que por sua vez foi realizada no período matutino.

As folhas foram separadas manualmente dos ramos e homogeneizadas assim que chegaram ao laboratório de Biologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, campus Medianeira. A fim de mantê-las frescas durante o processo de extração do óleo essencial, prepararam-se embalagens plásticas com 500 gramas de folhas que foram mantidas em refrigerador à aproximadamente 10 °C. No total foram utilizados 23 quilogramas de folha de moringa.

A extração do óleo essencial se deu através de hidrodestilação em aparelho Clevenger convencional. O balão tinha uma capacidade de 500 mL, o que possibilitou processar amostras de aproximadamente 160 gramas. O tempo da extração foi de 4h para cada amostra, conforme recomendação de Ehlert et al. (2006).

Na hidrodestilação, a água aquecida faz o vapor atravessar as estruturas da planta, forçando a quebra das bolsas intercelulares e a liberação do óleo essencial. No decorrer deste processo, as moléculas de óleo essencial evaporam junto com o vapor de água e em seguida, passam por um processo de resfriamento através de uma serpentina onde ocorre a condensação (ROSSATO et al., 2006) e obtenção do hidrolato (que consiste numa mistura de água e óleo essencial).

Na purificação do óleo essencial ou partição do hidrolato, utilizou-se o solvente n-hexano. Efetuou-se a leitura do volume do hidrolato e dividiu-se o valor por 3. A cada 100 mL de hidrolato eram realizadas triplicadas de 30 mL de n-hexano para lavagem em funil de separação. Esta divisão do solvente em alíquotas é prescrita porque melhores rendimentos de extração são obtidos dessa forma.

Colocou-se o hidrolato em funil de separação e adicionou-se o primeiro 1/3 de n-hexano em relação ao volume de hidrolato. Virou-se o funil mantendo firme a tampa e abriu-se a torneira para saída de vapor sem movimentos bruscos (repetiu-se este procedimento por mais 2 vezes). Deixou-se o funil de separação em repouso na garra afixada ao suporte universal até a separação das fases de acordo com as densidades. Na porção superior do funil concentrou-se a mistura n-hexano-óleo (o n-hexano é menos denso que a água e o óleo é imiscível na água).

A mistura n-hexano foi dividida em béqueres e seguiu para o banho-maria à temperatura de 60° C para evaporação do solvente e obtenção do óleo essencial

que foi acondicionado em recipiente de vidro tipo âmbar sob refrigeração.

Para análise da composição dos óleos voláteis empregou-se um cromatógrafo de fase gasosa Varian®, equipado com uma coluna DB-5 (25m x 0,20mm x 0,25µm de espessura do filme), e acoplado a um detector de espectrometria de massas (CG/EM). O hélio foi usado como gás de arraste num fluxo de 1,02 mL min⁻¹. O programa de aquecimento da coluna variou de 75°C – 150°C, a uma taxa de 4°C min⁻¹.

A identificação das substâncias contidas no óleo essencial de moringa foi realizada por comparação dos índices de retenção (IR) e do padrão de fragmentação dos espectros de massas com os registros da literatura científica especializada (ADAMS, 2007), com o banco de dados do computador conectado ao espectrômetro de massas e através da comparação dos espectros de massas com o espectro do banco de dados da biblioteca de espectros NIST - National Institute of Standards and Technology (NIST, 2014). Para o rendimento do óleo essencial foi utilizada a fórmula proposta por Gonçalves et al. (2009), onde o rendimento corresponde à massa de óleo essencial obtido em gramas x 100, dividido pela massa do material vegetal (g).

2.2 CAPACIDADE DE DIFUSÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE MORINGA

A fim de avaliar a capacidade do óleo essencial se difundir pelos tecidos cotiledonares da semente de feijão, procedeu-se o tratamento de 400 sementes de feijão do grupo comercial carioca com emulsão contendo 400 µL de óleo essencial de moringa, mais água destilada (99,60 mL) e Tween 80 (0,5%). As sementes foram acondicionadas em recipiente plástico contendo a emulsão e foram agitadas manualmente por 3 minutos e então dispostas sobre papel filtro para secarem naturalmente.

Na sequência, submeteu-se as sementes aos mesmos procedimentos do teste de germinação, em rolos de papel germitest por 24 horas em B.O.D, à 25 °C com fotoperíodo de 12 horas/luz conforme recomendação da RAS (BRASIL, 2009). Transcorrido este período, as sementes foram retiradas da B.O.D e seus tegumentos foram removidos manualmente para posterior secção das mesmas com auxílio de bisturi.

Os cotilédones por sua vez, foram submetidos à hidrodestilação em Clevenger seguindo-se a mesma metodologia da extração do óleo essencial da moringa. O óleo obtido foi encaminhado à Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo – USP, para caracterização dos compostos químicos presentes.

A partir do cromatograma do óleo essencial de moringa e do óleo obtido dos cotilédones de feijão, fez-se comparação destes e em seguida, dos espectros de massas dos picos correspondentes e não correspondentes de cada cromatograma, a fim de verificar se os componentes de óleo essencial difundiram-se pelos cotilédones.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE MORINGA

A hidrodestilação das folhas de *moringa* obteve rendimento de 0,02% com base na massa do produto fresco utilizado. O óleo produzido apresentou coloração amarela cuja composição está descrita na tabela 1.

Tabela 1 – Perfil cromatográfico do óleo essencial de folhas de *Moringa oleifera*.

Nº.	Classificação química	Componente	Tempo de Retenção	%
1	Terpeno	Linalol	15,08	1,28
2	Compostos aromáticos	Estearato de Metila	17,67	1,74
3	Compostos aromáticos	Ácido hexadecanóico	25,31	21,46
4	Compostos aromáticos	Octadecanoato de metila	26,22	5,87
5	Compostos aromáticos	Ácido 9,12-octadienóico	26,28	10,07
6	Compostos aromáticos	7 Octadecenoato de metila	27,04	11,63
7	Compostos aromáticos	Heptacosano	29,82	3,54
8	Compostos aromáticos	Tetracosanoato de metila	30,03	28,74
9	Compostos aromáticos	Heptacosano	30,90	4,01
10	Terpeno	Timol	31,91	2,49
11	Terpeno	B-Eudesmol	34,91	9,15

A análise por GC-EM permitiu a identificação de 99,98% dos constituintes integrados. No total foram identificados onze compostos, sendo que 87,08% do total

corresponde a compostos não terpenóides (hidrocarbonetos) e 12,92% por terpenos oxigenados.

Dentre os hidrocarbonetos, os mais abundantes foram o tetracosano (28,74%), hexadecano (21,46%), octadecano (17,5%) e heptacosano (7,55%). Em trabalhos anteriores, percentuais diferentes de hidrocarbonetos foram encontrados por Chuang et al. (2007) que identificaram como principais constituintes do óleo essencial de folhas de moringa, o pentacosano e o hexacosano. Por sua vez, nos experimentos de Marrufo et al. (2013) os principais componentes encontrados foram hexacosano, pentacosano e heptacosano.

Observa-se ainda na tabela 1, que 3,77% dos terpenos é composto por monoterpenos (linalol e timol) e 9,15% por sesquiterpeno (β -eudesmol).

Formados a partir do ácido mevalônico no citoplasma, ou do piruvato 3-fosfoglicerato no cloroplasto, os terpenos representam o grupo mais antigo de produtos constituídos por pequenas moléculas sintetizadas por plantas e provavelmente o grupo mais difundido de produtos naturais (PERES, 2004).

O linalol encontrado neste experimento também foi verificado na composição do óleo essencial de folhas de moringa cultivada em Moçambique em estudos realizados por Marrufo et al. (2013), diferindo dos resultados citados por Barreto et al. (2009) que encontraram fitol (21,6%) e timol (9,6%) com maior abundância no óleo essencial de moringa cultivada no estado do Ceará - BR.

É importante destacar que a composição química de um óleo essencial pode ser afetada dentre outros fatores, pela época de colheita da planta (CASTRO et al., 2010), horário de colheita (NASCIMENTO et al., 2006), temperatura, sazonalidade (BOTREL et al., 2010) e ciclo circadiano (ITENOV et al., 1999), justificando as diferenças entre os componentes de óleo essencial de moringa encontradas neste estudo e os resultados de Barreto et al. (2009).

A composição quantitativa e qualitativa dos metabólitos secundários das plantas é alterada durante suas fases de crescimento e varia de acordo com a idade e estado reprodutivo (LEAL et al., 2001), tendo em vista que esta composição é o resultado do balanço entre sua formação e transformação que ocorrem durante o crescimento do vegetal em decorrência de fatores genéticos, ambientais e de técnicas de cultivo (CASTRO et al., 2002). Desde modo, havendo interesse na utilização do óleo essencial de uma determinada espécie de planta para fins agrônômicos, químicos ou farmacológicos, deve-se considerar um estudo prévio de

sua composição química, haja vista a variabilidade química decorrente do ambiente de cultivo e diferenças genéticas.

Para Gonzáles-Lamothe et al. (2009), os produtos do metabolismo secundário acumulado pelos vegetais podem atuar potencializando sua atividade antibacteriana, favorecendo a atividade de antibióticos cuja ação encontra-se limitada por mecanismos de multirresistência desenvolvidos pelos micro-organismos; ou como atenuantes de virulência, adequando a resposta do sistema imune do hospedeiro à infecção.

Quanto ao mecanismo de ação antimicrobiano dos óleos essenciais, há um consenso de que este está associado principalmente à presença de compostos aromáticos e fenólicos que exercem efeito diretamente na membrana citoplasmática, alterando sua função e estrutura (HOLEY; PATEL, 2005).

Alguns dos compostos presentes nos óleos essenciais, mais especificamente os terpenos, desempenham importantes papéis no metabolismo primário, como o que ocorre em processos respiratórios e desenvolvimento celular do vegetal, mas também são produtos do metabolismo secundário, tendo como função principal intermediar a relação planta x ambiente (PHILLIPS et al., 2008).

O linalol (C₁₀H₁₈O) é um monoterpene alcoólico de cadeia aberta que tem sido amplamente testado como bactericida e fungicida. Para Greay e Hammer (2011), os monoterpene são capazes de promover mudança de potencial da membrana, perda de material citoplasmático e inibição da cadeia respiratória.

Sua ação fungicida foi testada, conforme relataram Lacerda et al. (2014) ao utilizarem óleo essencial de *Aniba duckei* (pau-rosa) onde o linalol é o componente encontrado em maior quantidade. Os ensaios demonstraram maior efeito antifúngico contra *Fusarium oxysporum* f.sp. *tracheiphilum* e *F. oxysporum* f.sp. *passiflorae* com 74,21% e 81,95% de inibição do crescimento micelial. Conforme estudos de Belaiche e Tantaoui (1995), o linalol presente no óleo essencial de eucalipto também apresentou atividade antimicrobiana significativa quando testado contra *Staphylococcus aureus*.

Também pertencente ao grupo dos monoterpene, o timol (C₁₀H₁₄O), com grande poder antimicrobiano vem sendo há muito estudado. Como bactericida e fungicida, sua atividade foi eficiente contra *Streptococcus* sp. (BOTELHO et al., 2007), *Staphylococcus aureus* (COSTA et al., 2011), *Microsporium canis*, *Candida* sp. (MAGALHÃES, 2009) e *Corynespora cassicola* (ROMERO et al., 2013).

Sendo um composto fenólico, o timol tem a capacidade de se ligar aos grupos amina e hidroxilamina de proteínas presentes nas membranas das bactérias provocando alterações em sua permeabilidade e causando a morte (JUVEN et al., 1994). Quanto à sua atividade antifúngica, segundo Zambonelli et al. (1996) pode ocorrer degeneração das hifas e liberação do conteúdo celular.

O β -Eudesmol ($C_{15}H_{26}O$) é um sesquiterpeno oxigenado também citado como antimicrobiano. Lima et al. (2008) constataram atividade bactericida do óleo essencial de *Salvia microphylla*, cujos componentes majoritários eram α -eudesmol (14,06%), β -eudesmol (8,74%) e γ -eudesmol (7,64%). Por sua vez, o β -eudesmol foi isolado do óleo essencial de *Desmostachya bipinnata* por Kumar, Patel e Choudhary (2010) que constaram seu efeito como antisalmonela.

Para Duke et al. (2002), adicionalmente a todas essas possibilidades de uso, os óleos essenciais revelam-se como potentes inibidores da germinação de sementes e do desenvolvimento de diferentes espécies de plantas.

O linalol encontrado neste experimento, isoladamente ou em associação com outros componentes foi responsável por comprometer a protrusão radicular e conseqüentemente a germinação de plantas daninhas (malícia e mata-pasto) em experimentos realizados por Souza Filho et al. (2009) ao utilizarem óleo essencial de *Ocimum americanum*. Por sua vez, os sesquiterpenos, quando utilizados em determinadas concentrações também podem atuar reduzindo drasticamente o comprimento radicular de plantas de rabanete, como foi observado por Abdelgaleil e Hashinaga (2007) ao utilizarem extratos de *Magnolia grandiflora* como fonte de sesquiterpenos.

Deste modo, uma vez que o óleo essencial de moringa seja utilizado como antimicrobiano no tratamento de sementes, devido à necessidade de substituição de insumos químicos nos agroecossistemas, é de grande importância a realização de ensaios de fitotoxidez a fim de avaliar sua alelopatia frente ao desenvolvimento do vegetal que receberá o produto.

Adicionalmente aos efeitos isolados dos componentes do óleo essencial, é preciso considerar o efeito sinérgico ou complementar entre eles, cuja definição consiste no efeito induzido por dois ou mais compostos juntos ser maior do que a soma dos efeitos de cada agente separadamente (BERENBAUM, 1989).

3.2 CAPACIDADE DE DIFUSÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE MORINGA

O óleo extraído dos cotilédones de feijão tratados com óleo essencial de moringa constatou a presença de ácidos graxos e terpenos (B-eudesmol, timol e linalol). Seus percentuais são apresentados na tabela 2.

Tabela 2 – Componentes do óleo extraído dos cotilédones do feijão.

Componente	Percentagem
Ácido graxo palmítico	15,6
Ácido graxo linoléico	14,2
Ácido graxo esteárico	12,9
Ácido graxo oléico	9,2
Ácido graxo docosanóico	6,3
Ácido graxo pentacosanóico	4,5
Ácido graxo eicosanóico	4,1
B-eudesmol	7,05
Timol	1,89
Linalol	0,9
Compostos aromáticos	23,36

Esta capacidade de penetração do óleo essencial nos tecidos vegetais é explicado devido ao fato dos óleos essenciais serem constituídos por substâncias de baixo peso molecular, geralmente lipofílicas, características estas, que permitem uma penetração eficiente na membrana celular. Estudos comprovaram que os óleos essenciais penetram nos tecidos cerca de 100 vezes mais rapidamente que a água (AFFONSO et al., 2012).

Esta característica (capacidade de penetração) do óleo essencial de moringa permite inferir que seus constituintes antimicrobianos podem manifestar efeito até mesmo para micro-organismos internos à semente, bem como, pode ser capaz de promover alterações bioquímicas e fisiológicas capazes de alterar o potencial fisiológico de sementes tratadas com estes produtos.

4 CONCLUSÕES

No óleo essencial de *Moringa oleifera* foram identificados onze compostos químicos, dentre os quais 87,08% correspondeu a hidrocarbonetos e 12,92% a terpenos oxigenados, dentre eles o linalol, timol e β -eudesmol, com potencial para ser utilizado em ensaios antimicrobianos em substituição aos produtos químicos usados na agricultura.

Na avaliação da capacidade de difusão dos componentes do óleo essencial, constatou-se que o sesquiterpeno e os monoterpenos penetraram nos cotilédones das sementes tratadas.

REFERÊNCIAS:

ABDELGALEIL, S.A.M.; HASHINAGA, F. Allelopathic potential of two sesquiterpene lactones from *Magnolia grandiflora* L. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.35, n.11, p.737-742, 2007.

ADAMS, R.P. **Identification of essential oils components by gas chromatography/mass spectroscopy**. 4.ed. Carol Stream: Allured, 2007. 469p.

AFFONSO, R.S.; RENNÓ, M.N.; SLANA, G.B.C.A.; FRANÇA, T.C.C. Aspectos Químicos e Biológicos do Óleo Essencial de Cravo da Índia. **Revista Virtual de Química**, v.4, n.2, p.146-161, 2012.

ANTUNES, M.D.C.; CAVACOB, A. The use of essential oils for postharvest decay control. A review. **Flavour Fragrance Journal**, v.25, n.5, p.351-366, 2010.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, n.2, p. 446-475, 2008.

BARRETO, M.B.; FREITAS, J.V.B.D.; SILVEIRA, E.R.; BEZERRA, A.M.E.; NUNES, E.P.; GRAMOSA, N.V. Volatile and non-volatile chemical constituents of *Moringa oleifera* Lam., Moringaceae. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v.19, n.4, p.893–897, 2009.

BELAICHE, T.; TANTAQUI, A.I.A. Application of a two levels factorial design to the study of the antimicrobial activity of three terpenes. **Sciences Aliments**, v.15, n.1, p.571-678, 1995.

BERENBAUM, M.C. What is synergy? **Pharmacological Reviews**, v.41, n.2, p.93-141, 1989.

BOTELHO, M.A.; NOGUEIRA, N.A.P.; BASTOS, G.M.; FONSECA, S.G.C.; LEMOS, T.L.G.; MATOS, F.J.A.; MONTENEGRO, D.; HEUKELBACH, J.; RAO, V.S.; BRITO, G.A.C. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.40, n.3, p. 349-356, 2007.

BOTREL, P.P.; PEREIRA PINTO, J.E.B.; FERRAZ, V.; BERTOLUCCI, S.K.V.; FIGUEIREDO, F.C. Teor e composição química do óleo essencial de *Hyptis marrubioides* Epl., Lamiaceae em função da sazonalidade. **Acta Scientiarum Agronomy**, v.32, n.3, p.533-538, 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA/ACS. 2009, 395p.

CASTRO, D. M.; MING, L. C.; MARQUES, M. O. M. Composição fitoquímica dos óleos essenciais de folhas da *Lippia alba* (Mill). em diferentes épocas de colheita e partes do ramo. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.4, n.2, p.75-79, 2002.

CASTRO, H.G.; PERINI, V.B.M.; SANTOS, G.R.; LEAL, T.C.A.B. Avaliação do teor e composição do óleo essencial de *Cymbopogon nardus* (L) em diferentes épocas de colheita. **Revista Ciência Agrônômica**, v.41, n.2, p.308-314, 2010.

CHUANG, P.H.; LEE, C.W.; CHOUU, J.Y.; MURUGAN, M.; SHIEN, B.J. CHEN CHEN, H.M. Anti-fungal activity of crude extracts and essential oil of *Moringa oleifera* Lam. **Bioresource Technology**, v.98, n.2, p.232-236, 2007.

COSTA, J.P.R.; ALMEIDA, A.C.; MARTINS, E.R.; RODRIGUES, M.N.; SANTOS, C.A.; MENEZES, I.R. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim-pimenta e do extrato bruto seco do barbatimão diante de bactérias isoladas do leite. **Biotemas**, v.24, n.4, 01-06, 2011.

CVEJIC, J.H.; ROHMER, M. CO₂ as main carbon source for isoprenoid biosynthesis via the mevalonate-independent methylerythritol 4-phosphate route in the marine diatoms *Phaeodactylum tricornutum* and *Nitzschia ovalis*. **Phytochemistry**, v.53, n.1, p. 21-28, 2000.

DUARTE, M.C.T. Atividade Antimicrobiana de Plantas Mediciniais e Aromáticas Utilizadas no Brasil. **MultiCiência**, v.7, n.1, p.18-34, 2006.

DUKE, S.O.; DAYAN, F.E.; RIMANDO, A.M.; SCHIRADER, K.K.; ALIOTTA, G.; OLIVA, A.; ROMAGNI, J.G. Chemical from nature for weed management. **Weed Science**, v.50, n.2, p.138-1, 2002..

DWIVEDI, S.K.; NEETU, D. Antifungal activity of some plant extracts against guava wilt pathogen. **International Journal of Environmental Sciences**, v.3, n.1, p.312-320, 2012.

EHLERT, P.A.D.; BLANK, A.F.; ARRIGONI-BLANK, M.F.; PAULA, J.W.A.; CAMPOS, D.A.; ALVIANO, C.S. Tempo de hidrodestilação na extração de óleo essencial de

sete espécies de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.8, n.2, p.79-80, 2006.

GILL, A.O.; HOLLEY, R.A. Mechanisms of bactericidal action of cinnamaldehyde against *Listeria monocytogenes* and of eugenol against *L. monocytogenes* and *Lactobacillus sakei*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, n.10, p.5750–5755, 2004.

GOBBO, N.; LOPES, N.P. Plantas Mediciniais: fatores de influência do conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v.30, n.2, p.374-381, 2007.

GONÇALVES, G.G; MANCINELLI, R.C.; MORAIS, L.A.S. Influência do horário de corte no rendimento de óleo essencial de alfavaquinha e alecrim. **Horticultura Brasileira**, v.27, n.2, p.108-112, 2009.

GONZALES-LAMOTHE, R.; MITCHEL, G.; GATTUSO, M.; DIARRA, M.S.; MALOUIN, F.; BOUARAB, K. Plant antimicrobial agents and their effects on plant and human pathogens. **International Journal of Molecular Sciences**, v.10, n.8, p. 3400-19, 2009.

GREAY, S.J.; HAMMER, K.A. Recent developments in the bioactivity of mono- and diterpenes: anticancer and antimicrobial activity. **Phytochemistry Reviews**, v.65, n.4, p.208-223, 2011.

GUENTHER, E. **The Essential Oils**. 3 ed. New York: D. Van Nostrand Company, 1959. 456p.

HOLLEY, R.A.; PATEL, D. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. **Food Microbiology**, v.22, n.4, p.273-292, 2005.

ITENOV, K.; MOLGAAARD, P.; NYMAN, U. Diurnal fluctuations of the alkaloid concentration in latex of poppy *Papaver somniferum* is due to day–night fluctuations of the latex water content. **Phytochemistry**, v.52, n.7, p. 1229-34, 1999.

JAMIL, A.; SHAHID, MUHAMMAD.; KHAN, M.M.U.H.; ASHRAF, MUHAMMAD. Screening of some medicinal plants for isolation of antifungal proteins and peptides. **Pakistan Journal of Botany**, v.39, n.1, p.211-221, 2007.

JUVEN, B.J.; KANNER, J.; SCHUED, F.; WEISSLOWICH, H. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. **Journal Applied of Bacteriology**, v.76, n.4, p.626-631, 1994.

KUMAR, K.A.; PATEL, S.; CHOUDHARY, K. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Desmostachya bipinnata* Linn. **International Journal of Phytomedicine**, v.2, n.4, p.436-439, 2010.

LACERDA, H.; FILHO, V.; EVERTON, P.; OLIVEIRA, R.; SOUZA D.; COELHO, M.; SILVA, F.; BORGES, J.; PEREIRA, V.; CARDOSO, C. Atividade fungitóxica do óleo essencial de *Aniba duckei* (Pau-rosa). In: 54^o. CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA, 54, 2014, Natal. **Anais...Natal:Química e Sociedade**, 2014, p.45-51.

LEAL, T.C.A.B.; NASCIMENTO, A.; ROSA, A.J.; GUIMARÃES, R.I. Avaliação do efeito da variação estacional e horário de colheita sobre o teor foliar de óleo essencial de capim-cidreira (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf). **Revista Ceres**, v. 48, n. 278, p. 445-453, 2001.

LIMA, R.K. **Óleos essenciais de *Myrtia fragrans* e de *Salvia microphylla*: caracterização química, atividade biológica e antioxidante**. 2008.160 p. Tese. (Doutorado em Agroquímica) – Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2008.

MAGALHÃES, D.V. **Atividade antifúngica de derivados sintéticos do eugenol e timol frente a cepas de *Candida spp.* e *Microsporum canis***. 2009. 96 p. Dissertação. (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2009.

MARRUFO, T.; NAZARRO, F.; MANCINI, E.; FRATIANNI, F.; COPPOLA, R.; MARTINO, L.; AGOSTINHO, A. B.; DE FEO, V. Chemical Composition and Biological Activity of the Essential Oil from Leaves of *Moringa oleifera* Lam. Cultivated in Mozambique. **Molecules**, v.18, n.9, p.10.989-11.000, 2013.

MOYO, B.; MASIKA, P.J.; MUCHENJE, V. Antimicrobial activities of *Moringa oleifera* Lam leaf extracts. **African Journal of Biotechnology**, v.11, n.11, p.2797-2802, 2012.

NASCIMENTO, I.B.; INNECCO, R.; MATOS, S.H.; BORGES, N.S.S.; MARCO, C.A. Influência do horário de corte na produção de óleo essencial de campim-santo (*Andropogum sp.*). **Caatinga**, v.19, n.2, p.123-127, 2006.
National Institute of Standards and Technology - NIST: disponível em <www.nist.gov>. Acesso em 12 de Setembro de 2014.

PERES, L.E.P. **Metabolismo Secundário. Piracicaba** – São Paulo: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. ESALQ/USP, 2004. p.1-10.

PHILLIPS, M.A.; LEON, P.; BORONAT, A.; RODRIGUEZ-CONCEPCION, M. The plastidial MEP pathway: unified nomenclature and resources. **Trends in Plant Science**, v.13, n.12, p. 619-23, 2008.

ROMERO, A.L.; OLIVEIRA, R.R.; ROMERO, R.B.; ALMEIDA, A.L.; SEVERO DE SOUZA, P.S.; VIDA, J.B. Efeito de monoterpenos naturais no crescimento micelial e germinação de conídios de *Corynespora cassiicola*. **Pesquisa Agropecuária Pernambucana**, v.18, n.1, p.3-7, 2013.

ROSSATO, M.; SANTOS, A. C. A.; SERAFINI, L. A.; AGOSTINI, F.; PANSERA, M. R.; WASUM, R.; BARBIERI, R. L. **Química Nova**, v.29, nº.2, p.200-202, 2006.
SANGWAN, N.S.; FAROOQI, A.H.A.; SHABIH, F.; SANGWAN, R.S. Regulation of essential oil production in plants. **Plant Growth Regulation**, v.98, n.1, p.367-372, 2001.

SHI, Q.; LI, C.; FUZUO, Z. Nicotine synthesis in *Nicotiana tabacum* L. induced by mechanical wounding is regulated by auxin. **Journal of Experimental Botany**, v.57,

n.11, p. 2899–2907, 2006.

SOUZA FILHO, A.P.S.; BAYMA, J.C.; GUILHON, G.M.S.P.; ZOGHBI, M.G.B. Atividade potencialmente alelopática do óleo essencial de *Ocimum americanum*. **Planta daninha**, v.27, n.3, p.499-505, 2009.

ZAMBONELLI, A.; DAULERIO, A.Z.; ALBASINI, A. Effects of essential oils on phytopathogenic fungi in vitro. **Journal of Phytopathology**, v.144, n.9, p.491-494, 1996.

ARTIGO 2 CONTROLE DE FUNGOS DE ARMAZENAMENTO E *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* L. EM SEMENTES DE *Phaseolus vulgaris* L. TRATADAS COM ÓLEO ESSENCIAL DE *Moringa oleifera* Lam.

Resumo: objetivou-se com este trabalho, avaliar o efeito fungicida e bactericida do óleo essencial das folhas de *Moringa oleifera* (OEM) em meio de cultura e diretamente nas sementes de feijão das cultivares IPR Colibri e IPR Campos Gerais. O OEM foi utilizado nas concentrações de 0,1%; 0,2%; 0,4% e 0,8% para avaliação da germinação de esporos e porcentagem de incidência de fungos (*blotter test*), bem como para inibição da multiplicação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. Fungicida (carboxin+thiram) e antibiótico (hidróxido de cobre) foram utilizados como tratamentos controle. Os efeitos das doses do OEM sobre a germinação de esporos fúngicos e o crescimento bacteriano foram avaliados por meio de equações de regressão e as médias dos tratamentos quantitativos (doses de OEM) foram comparadas aos tratamentos sintéticos por meio do teste de Dunnett. A dose contendo 0,4% de OEM foi estatisticamente igual ao fungicida na incidência de *A. flavus*, *Fusarium* sp. e *Alternaria* sp. Na germinação de esporos, as doses crescentes de OEM se ajustaram ao modelo linear decrescente para *Rhizopus* sp. e *Fusarium* sp., enquanto que para *A. flavus*, *A. niger* e *A. ochraceus* houve ajuste por meio do modelo quadrático. Para *Penicillium* sp. e *Alternaria* sp., o modelo raiz quadrada foi o que melhor se ajustou aos dados, no entanto, as doses não foram estatisticamente iguais ao fungicida. Quanto ao efeito bactericida do OEM, houve ajuste por meio do modelo raiz quadrada com máximo de unidades formadoras de colônia estimado com 1,89% de OEM. Nenhuma das doses de OEM foi estatisticamente igual ao bactericida sintético.

Palavras-chave: antimicrobiano, tratamento de sementes, controle alternativo.

CONTROL STORAGE FUNGI AND *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* L. IN *Phaseolus vulgaris* L. SEEDS TREATED WITH *Moringa oleifera* Lam ESSENTIAL OIL.

Abstract: This study investigated the fungicidal and bactericidal effect of the essential oil from the leaves of *Moringa oleifera* (EOM) in culture medium and directly in the bean seeds of IPR Campos Gerais and IPR Colibri cultivar. The EOM was used at concentrations of 0,1%; 0,2%; 0,4% and 0,8% for evaluation of spore germination and percentage of fungi incidence (*blotter test*), as well as for inhibiting the multiplication of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. Fungicide (carboxin + thiram) and antibiotic (copper hydroxide) were used as control treatments. The effects of EOM doses on germination of fungal spores and bacterial growth was evaluated by regression equations and the mean quantitative treatments (EOM dose) were compared to synthetic treatment by Dunnett's test. The dose containing 0,4% EOM was statistically similar to the fungicide in the incidence of *A. flavus*, *Fusarium* sp. and *Alternaria* sp. In spore germination, increasing doses of EOM set to decreasing linear model for *Rhizopus* sp. and *Fusarium* sp., whereas for *A. flavus*, *A.*

niger and *A. ochraceus* was adjusted by means of the quadratic model. To *Penicillium* sp. and *Alternaria* sp., the square root model was the best fit to the data, however, the doses were not statistically equal to the fungicide. As for the bactericidal effect, the EOM, was set by the square root model with maximum colony forming units estimated 1,89% of OEM. None of EOM doses was statistically equal to synthetic antibacterial.

Keywords: antimicrobial, seed treatment, alternative control.

1 INTRODUÇÃO

O cultivo do feijão no Brasil envolve aproximadamente dois milhões de produtores, com cerca de 65% da produção envolvendo a agricultura familiar, que cada vez mais se interessa pelo sistema de produção orgânica, uma vez que visam aumento da rentabilidade e melhoria da qualidade de vida no meio rural (CTSFB, 2012).

Para Abrantes et al. (2011), devido à ampla adaptação edafoclimática, o feijoeiro tem seu cultivo permitido durante todo o ano, em quase todas as unidades da federação brasileira, nas diferentes épocas e safras, fazendo com que esteja sob diversas condições ambientais, fator este, que expõe a planta deixando-a vulnerável à fitopatógenos, tendo em vista que há mais de duzentas doenças capazes de afetar a cultura do feijão.

Deste modo, segundo Silva et al. (2008), o sucesso da lavoura sofre interferência direta da qualidade sanitária e fisiológica das sementes, e uma das causas constantes de insucesso é a ocorrência de patógenos transmitidos pelas mesmas. Assim, o uso de sementes com elevado padrão de sanidade é uma das principais medidas de controle de doenças, muito embora haja várias cultivares de feijão resistentes à diversas doenças (SPONCHIADO et al., 2013).

Os fungos de armazenamento podem estar presentes como contaminantes, ou na forma de micélios dormentes entre os tecidos do pericarpo ou do tegumento das sementes, podendo provocar danos como apodrecimento, redução da germinação e o desenvolvimento de plântulas anormais. Os principais gêneros são *Aspergillus* e *Penicillium* (MACHADO, 2000).

Quanto aos fungos de campo, causadores de doenças nas plantas, destacam-se: antracnose, causada por *Colletotrichum lindemuthianum*; amarelecimento de fusarium, causada por *Fusarium oxysporum*; podridão radicular

de rhizoctonia (*Rhizoctonia solani*), mancha de alternaria (*Alternaria* sp.) e mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*), dentre outras. Há também, doenças causadas por procariontes, como é o caso do crestamento bacteriano comum do feijoeiro, causado pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (BIANCHINI, MARINGONI e CARNEIRO, 2005).

A fim de controlar os principais patógenos transmitidos pelas sementes, há diversos produtos químicos registrados no mercado, cujo objetivo é de proporcionar o controle dos micro-organismos nas sementes e dar proteção inicial perante os patógenos sobreviventes no solo ou restos culturais (GOULART, 2010). No entanto, a maioria dos produtos para tratamento de sementes são sintéticos, o que impede a utilização no setor orgânico.

No tocante aos micro-organismos, em longo prazo, os pesticidas podem favorecer o surgimento de isolados de fitopatógenos resistentes às substâncias químicas (MENEZES et al., 2009) e, vale ainda salientar, que qualquer que seja o caminho do agrotóxico no meio ambiente, invariavelmente o homem é seu potencial receptor (MMA, 2014). Como alternativa, faz-se necessário buscar meios sustentáveis para o controle de doenças nas mais diversas culturas, como extratos e óleos essenciais provenientes de plantas com propriedades fungicidas e bactericidas para controlar a microbiota fitopatogênica associada às sementes (GARCIA et al., 2012).

Por conter em sua composição substâncias químicas atuantes como antibiótico e fungicida, a *Moringa oleifera* (Lam) tem sido estudada a fim de se encontrar compostos capazes de atuar como antimicrobianos nos mais diversos gêneros microbianos.

Estudos demonstraram a eficiência do extrato metanólico de moringa sobre o crescimento micelial de *Fusarium oxysporum*, *Cladosporim sphaerospermum* e *Colletotrichum lindemuthianum* (SILVA et al., 2009). Há também, de acordo com Donli e Dauda (2003), redução na incidência de *Mucor* sp, *Aspergillus niger*, *Rhizopus stolonifer* e *Aspergillus flavus* após utilização do extrato aquoso de moringa em sementes de amendoim (*Arachis hypogea*) nas concentrações de 5, 10, 15 e 20 g L⁻¹. Na inibição do crescimento bacteriano, a moringa apresentou resultados positivos contra *Xanthomonas oryzae* (SHEHU et al., 2013).

Neste contexto, este trabalho objetivou avaliar o efeito fungicida e bactericida de diferentes doses de óleo essencial de moringa em meio de cultura e diretamente nas sementes de feijão das cultivares IPR Colibri e IPR Campos Gerais.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E PROCEDIMENTOS ESTATÍSTICOS.

Na investigação da presença de fungos nas cultivares de feijão carioca, utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC) com sete tratamentos (cultivares IAPAR 81, IPR Andorinha, IPR Campos Gerais, IPR Colibri, IPR Tangará, IPR Curió e IPR 139) e quatro repetições de 100 sementes por unidade experimental (BRASIL, 2009), enquanto que, para a detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* utilizou-se 100 sementes por tratamento e quatro repetições (ISTA, 2012). Os resultados foram expressos em percentual, com duas casas decimais (BRASIL, 2009).

Na avaliação do efeito do OEM sobre o percentual de germinação de esporos fúngicos utilizou-se cinco tratamentos (0,0%; 0,1%; 0,2%; 0,4% e 0,8%) e quatro repetições de 100 sementes (BRASIL, 2009) por parcela, os quais foram distribuídos em DIC. As variáveis foram transformadas utilizando-se a transformação $\sqrt{(x+1)}$.

A normalidade e a homogeneidade dos erros experimentais foram verificadas por meio dos testes de Shapiro-Wilk e de Levene, respectivamente. A seguir, os dados foram submetidos à análise de variância e as médias obtidas foram comparadas ($P > 0,05$) pelo teste de Dunnett.

Os efeitos das doses de óleo essencial sobre a incidência de fungos e bactéria, bem como a germinação de esporos fúngicos e o crescimento bacteriano foram avaliados por meio de equações de regressão, em que foram utilizados a significância dos parâmetros dos modelos, por meio do teste t, e o maior valor de coeficiente de determinação (R^2) para a seleção dos modelos que melhor se ajustaram aos dados médios das características.

As comparações de médias entre os tratamentos quantitativos (0,0%; 0,1%; 0,2%; 0,4% e 0,8% de OEM) contra o tratamento bactericida e o tratamento fungicida foram realizadas por meio de contrastes, utilizando-se do teste F. As comparações de médias envolvendo cada dose contra o tratamento bactericida e o

tratamento fungicida foram realizadas pelo teste de Dunnett. O nível de 5% de significância foi adotado em todos os testes de hipóteses e as análises estatísticas foram feitas utilizando-se o Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas (SAEG, 2007).

2.2 QUALIDADE SANITÁRIA DAS CULTIVARES

As cultivares IAPAR 81, IPR Andorinha, IPR Campos Gerais, IPR Colibri, IPR Tangará, IPR Curió e IPR 139 utilizadas nos experimentos pertenciam à categoria de sementes C2 e foram fornecidas pelo Instituto Agrônomo do Paraná – IAPAR.

Em setembro de 2013, após a determinação do grau de umidade, realizado pelo método padrão da estufa (BRASIL, 2009), as sementes com 12% de umidade, foram armazenadas em recipientes de vidro autoclavados e mantidas em câmara fria ($15\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5,55\% \pm 5\text{ UR}$) na Estação Experimental de Horticultura e Controle Biológico, Professor Mario Cesar Lopes, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE, campus Marechal Cândido Rondon.

A identificação dos fungos associados às cultivares foi realizada através do método de papel filtro (*Blotter test*). Foram semeados cinco gerbox por repetição, com 20 sementes por gerbox e quatro repetições, totalizando 400 sementes que foram incubadas a $26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$, com fotoperíodo de 12 h/luz, por sete dias. Para reduzir o processo de germinação das sementes durante o período de incubação, o substrato de papel foi umedecido em solução de sal de 2,4-D (2,4-diclorofenoxiacetato de sódio) a 5 mg L^{-1} de concentração (BRASIL, 2009).

Finalizado este período, as sementes foram examinadas individualmente com auxílio de um estereomicroscópio em aumento de 30-80X, pela ocorrência de frutificações típicas do crescimento de fungos para posterior identificação através da chave taxonômica de Barnet e Hunter (1986).

A fim de obter culturas puras dos fungos identificados nas cultivares de feijão, micélios fúngicos foram repicados para placas de Petri autoclavadas contendo meio BDA (batata-dextrose-ágar) e mantidas em B.O.D à $26\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante sete dias.

Para detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, foram suspensas 100 sementes de feijão carioca de cada cultivar em solução salina estéril mais Tween 20% (0,02% v/v) em béquer de 100 mL, permanecendo embebidas durante 16-18 horas a $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Transcorrido este período, após homogeneização,

preparou-se uma série de diluições de 10 vezes a partir do extrato da semente e, em seguida, pipetou-se 100 μL de cada diluição e do extrato de sementes não diluído em placas de Petri autoclavadas, contendo meio de cultura seletivo Milk Tween, e espalhados com alça de Drigalski. As placas foram incubadas invertidas a $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e examinadas após 4-5 dias a fim de observar colônias amareladas, típicas da bactéria em questão (ISTA, 2012). Os resultados foram apresentados de acordo com o número de unidades formadoras de colônias na diluição equivalente à 10^6 UFC mL^{-1} .

A comprovação dos isolados bacterianos foi realizado mediante testes de hipersensibilidade em plantas de fumo e patogenicidade em plantas de feijão, seguindo-se a recomendação de Romeiro (2001). Preparou-se uma suspensão bacteriana (5×10^8 UFC mL^{-1}) que foi inoculada por pressão com ajuda de uma seringa hipodérmica fina nas plantas de fumo e feijão. A testemunha foi inoculada com solução salina a 0,85% e após 15 dias, observou-se os sintomas.

Após a realização do teste de sanidade, selecionou-se duas cultivares com base nos resultados obtidos. Optou-se pelas cultivares (IPR Colibri e IPR Campos Gerais) com maior diversidade de fungos e presença de bactéria fitopatogênica.

2.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE MORINGA EM SEMENTES TRATADAS

Para obtenção do óleo essencial, coletou-se folhas jovens de moringa, pertencentes à 10 diferentes matrizes com 2,5 anos de idade, provenientes da cidade de Cascavel, PR durante o mês de maio de 2014. O óleo essencial das folhas moringa foi obtido através de hidrodestilação em extrator tipo Clevenger, utilizando-se o solvente n-hexano, no Laboratório de Biologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR, campus Medianeira. Seus compostos foram caracterizados utilizando-se a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, no Instituto de Química da USP.

Para o tratamento das sementes de feijão das cultivares IPR Colibri e Campos Gerais, preparou-se uma emulsão contendo água destilada esterilizada e Tween 80 (0,5%) nos volumes de 100; 99,95; 99,90; 99,80 e 99,60 mL, mais as doses 0 μL , 50 μL , 100 μL , 200 μL e 400 μL de óleo essencial de moringa que equivaleram a 0; 0,1; 0,2; 0,4 e 0,8%.

Os demais tratamentos consistiram em um fungicida e um bactericida usados para o tratamento de sementes, segundo recomendações do Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA (AGROFIT, 2014), sendo portanto, o fungicida Carboxin + Thiram ($200 \text{ g L}^{-1} + 200 \text{ g L}^{-1}$) e o bactericida cujo princípio ativo é o Hidróxido de Cobre (538 g Kg^{-1}), aplicados segundo instruções de uso dos fabricantes.

As sementes e os tratamentos foram acondicionados em sacos plásticos e submetidos à agitação manual por 3 min, em seguida, foram deixadas para secar em temperatura ambiente (em torno de $26 \text{ }^{\circ}\text{C}$).

Na avaliação da qualidade sanitária (método *Blotter test*) (BRASIL, 2009) para investigar a presença de fungos fitopatogênicos, utilizou-se todos os tratamentos exceto o bactericida. Por sua vez, todos os tratamentos foram utilizados, exceto o fungicida, na avaliação do efeito bactericida dos tratamentos. Este foi realizado conforme recomendações da International Seed Testing Association - ISTA (2012). Os resultados foram apresentados em porcentagem.

2.4 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE FUNGICIDA DO ÓLEO ESSENCIAL DE MORINGA

Para o ensaio de inibição da germinação de esporos, preparou-se uma suspensão de esporos dos fungos isolados que continham sete dias de crescimento, através da adição de 10 mL de água destilada às placas de Petri. Com o auxílio da alça de Drigalski, realizou-se leve fricção da colônia fúngica, de modo que fossem liberadas as estruturas reprodutivas do fungo do meio de cultura. A solução formada foi filtrada em béquer, com auxílio de funil de vidro e gaze, possibilitando a passagem da suspensão de água contendo esporos e retenção das hifas. A suspensão foi então homogeneizada e quantificado o número de esporos em câmara de Neubauer. Padronizou-se a concentração de esporos para 1×10^4 esporos mL^{-1} .

O ensaio de germinação de esporos foi feito em placas de Petri. Em cada placa, colocou-se um disco de papel filtro umedecido com 10 mL de água destilada esterilizada e uma lâmina de vidro para microscopia. Sobre cada lâmina colocou-se 1 mL de ágar-água a 1% e sobre o meio já solidificado, acrescentou-se 50 μL de esporos fúngicos na concentração determinada acima e 50 μL dos tratamentos.

Utilizou-se seis repetições por tratamento que totalizaram 42 parcelas para cada gênero fúngico.

Finalizado o período de incubação (24 h) foi depositada uma gota do corante azul de algodão (lactofenol) sobre cada lâmina, de modo a paralisar a germinação de esporos em todos os tratamentos, além de auxiliar na visualização das estruturas reprodutivas do fungo, procedendo então à determinação ao microscópio ótico. Foram contabilizados 100 esporos por lâmina, sendo considerados germinados aqueles que apresentaram 2/3 do desenvolvimento tubo germinativo. Os resultados foram expressos em porcentagem.

Para o preparo dos tratamentos contendo o óleo essencial de moringa, utilizou-se água destilada esterilizada mais Tween 80 (0,5%) nos volumes de 5; 4,95; 4,90; 4,80 e 4,60 mL, mais as doses 0 μ L, 5 μ L, 10 μ L, 20 μ L e 40 μ L de óleo essencial de moringa que equivaleram a 0; 0,1; 0,2; 0,4 e 0,8%, além do tratamento contendo Carboxin + Thiram.

2.5 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE BACTERICIDA DO ÓLEO ESSENCIAL DE MORINGA

Antes da realização do ensaio para a atividade bactericida do OEM sobre *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Xap), obteve-se a curva de crescimento bacteriano, pelo método de determinação da concentração do inóculo pela contagem em placas, descrito por Mariano e Assis (2000). Foi preparada uma suspensão da bactéria em solução salina (NaCl 0,85%) a partir da cultura em placas com 48 h de incubação.

Foram ajustadas concentrações bacterianas para obter leituras de absorbância a 560 nm de 1,2; 0,8; 0,6; 0,4; 0,2 e 0,0. Cada uma das suspensões foi diluída até 10⁸, 10⁷ e 10⁶. Foram pipetados 0,05 mL de cada diluição em placas de Petri com meio ágar-nutriente, e espalhados uniformemente com alça de vidro flambada. Preparou-se quatro placas para cada diluição, as quais foram invertidas e incubadas a 25 °C por 48 h. Foi obtida pelo menos uma série de placas contáveis (que apresentasse entre 30 a 300 colônias) para cada absorbância. O cálculo da concentração da suspensão foi efetuado com base no número de unidades formadoras de colônia (UFC).

Na avaliação da atividade bactericida do OEM, foram utilizados tubos de

ensaio previamente autoclavados contendo 10; 9,995; 9,990; 9,980 e 9,960 mL de caldo nutriente e, as doses de óleo essencial (0; 5µL; 10µL; 20µL e 40µL) que equivaleram a 0; 0,1; 0,2; 0,4 e 0,8%. Uma alíquota de 100 µL de suspensão de células bacterianas contendo 10^8 UFC mL⁻¹ foi adicionada a cada tubo, os quais foram incubados a 28 °C por 48 h em estufa incubadora sob agitação a 150 rpm.

A avaliação do número de bactérias foi realizada por espectrofotômetro, anotando-se a absorbância a 560 nm de cada amostra e calculando-se o valor de UFCs de acordo com a curva de crescimento bacteriano previamente elaborada. Apenas o meio de cultura foi utilizado como tratamento controle.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 QUALIDADE SANITÁRIA DAS CULTIVARES

Os resultados da análise sanitária (Tabela 1) indicam maior percentual de sementes infectadas por fungos nas cultivares IPR Tangará, IAPAR 81, IPR Campos Gerais e IPR Colibri.

Tabela 1 - Incidência de fungos (%) e de *Xap* (UFC mL⁻¹) em sementes de cultivares de feijão provenientes do Estado do Paraná.

Fungos	Cultivares						
	IPR Andorinha	IPR Campos Gerais	IPR Colibri	IPR Curió	IPR Tangará	IAPAR 139	IAPAR 81
<i>Alternaria</i> sp.	-	1,00	2,00	-	-	1,00	-
<i>Aspergillus flavus</i>	1,25	6,00	3,00	4,25	6,25	1,25	2,25
<i>Aspergillus niger</i>	1,00	0,25	0,50	1,50	2,25	-	2,25
<i>Aspergillus ochraceus</i>	-	1,25	4,25	3,75	6,75	-	0,25
<i>Fusarium</i> sp.	2,50	2,50	0,5	-	1,25	-	-
<i>Penicillium</i> sp.	1,50	1,00	1,00	8,75	1,75	7,25	15,25
<i>Rhizopus</i> sp.	-	1,25	1,75	2,00	1,00	1,00	1,00
Total	6,25	13,25	13,00	20,25	19,25	10,5	21,00
<i>Xanthomonas</i>	-	20	40	-	-	100	80

O *Penicillium* sp. e o *A. flavus* estiveram presentes em todas as cultivares avaliadas, com percentuais variando de 1% a 15,25% para o *Penicillium* sp., e

1,25% a 6% para *A. flavus*. Os gêneros citados são grandes responsáveis pela produção das micotoxinas encontradas em produtos alimentícios e grãos, sendo os cereais e as fabáceas, os produtos mais afetados (SILVA et al., 2008).

O *Fusarium* sp., cujos maiores percentuais foram constatados nas cultivares IPR Andorinha e IPR Campos Gerais, é causador da murcha de fusarium e podridão radicular no feijoeiro. Trata-se de um micro-organismo que sobrevive no solo e interior das sementes sendo capaz de causar grandes perdas na cultura.

Quanto à Xap, observa-se que esteve presente nas cultivares IPR Campos Gerais, IPR Colibri, IAPAR 139 e IAPAR 81. Este fitopatógeno tem se disseminado em praticamente todas as regiões produtoras, porém com maior importância no Paraná, Rio de Janeiro e São Paulo, e é causador do crestamento bacteriano comum. Dentre os diversos meios de sobrevivência da Xap, a semente representa o mais eficiente, tendo em vista que bactérias se localizam em seu interior, superfície ou simplesmente, acompanham as sementes (TORRES et al., 2009).

As diferenças encontradas na incidência de fitopatógenos entre as cultivares podem estar relacionadas às condições de cultivo e armazenamento das mesmas, assim como, com o advento da irrigação, a cultura do feijão passou a ter plantio contínuo, possibilitando que um complexo de doenças causadas por patógenos veiculados pelo solo adquirisse grande importância.

Com base nos resultados da qualidade sanitária, optou-se por utilizar as cultivares IPR Campos Gerais e IPR Colibri por apresentarem percentual próximo de infecção por fungos, bem como, a presença da bactéria Xap.

3.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE MORINGA EM SEMENTES TRATADAS

A porcentagem de incidência de fungos (*blotter test*) em sementes de feijão da Cultivar IPR Campos Gerais tratadas com óleo essencial de moringa e fungicida são apresentados na tabela 2.

Tabela 2 – Porcentagem de incidência de fungos em sementes de feijão da cultivar IPR Campos Gerais tratadas com óleo essencial de moringa (OEM) e fungicida. Valores transformados por $\sqrt{(x+1)}$.

Tratamentos	Fungos				
	A. <i>flavus</i>	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Alternaria</i> sp.	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Rhizopus</i> sp.
0,0	2,73*	1,93*	1,99*	13,00*	2,90*
0,1	2,33*	1,68*	1,86*	12,50*	2,89*
0,2	1,92*	1,45	1,35	13,00*	2,80*
0,4	1,25	1,36	1,10	10,25*	3,47*
0,8	1,10	1,10	1,00	10,50*	3,38*
Fungicida*	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C.V	9,11	7,79	7,53	22,52	23,01

Médias seguidas por asterisco diferem do tratamento fungicida (*) pelo teste de Dunnett ao nível de 5% de probabilidade;

* Carboxin + Thiram (200 g L⁻¹ + 200 g L⁻¹)

Com exceção dos gêneros *Penicillium* sp. e *Rhizopus* sp., cujas médias estimadas em todos os tratamentos diferiram do fungicida, os demais fungos foram controlados pelo OEM a partir de 0,4%, como é caso do *A. flavus*, e 0,2% para *Fusarium* sp. e *Alternaria* sp., com a mesma eficiência que o fungicida sintético.

A ausência de efeito sobre *Penicillium* sp. e *Rhizopus* sp. podem estar relacionados à concentração de óleo essencial utilizado no experimento, tendo em vista que em outros experimentos já realizados que faziam uso de maiores concentrações de óleo essencial de moringa, constatou-se inibição de ambos os gêneros citados (BUKAR, UBA; OYEYI, 2010).

A respeito do efeito observado do OEM, salienta-se que seu caráter lipofílico permite atravessar a membrana plasmática e a mitocôndria dos micro-organismos, desestabilizando essas estruturas e tornando-as mais permeáveis, perdendo íons e outros conteúdos celulares. No entanto, sua atividade biológica não é atribuída a um único mecanismo de ação, uma vez que a grande variedade de grupos químicos presentes permite que haja vários alvos na célula (BAKKALI et al., 2008).

A incidência de fungos nas sementes da cultivar IPR Colibri tratadas com óleo essencial de moringa (OEM) e fungicida é apresentada na tabela 3.

Tabela 3 – Porcentagem de incidência de fungos em sementes de feijão da cultivar IPR Colibri tratadas com óleo essencial de moringa (OEM) e fungicida. Valores transformados por $\sqrt{(x+1)}$.

Concentração de OEM (%)	Fungos				
	<i>A. flavus</i>	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Alternaria</i> sp.	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Rhizopus</i> sp.
0,0	2,63*	3,25*	3,65*	3,41*	3,50*
0,1	2,03*	2,37*	2,75*	3,29*	3,41*
0,2	1,85*	1,77*	2,02*	3,40*	3,40*
0,4	1,53	1,05	1,52	3,34*	3,47*
0,8	1,20	0,55	0,77	3,40*	3,36*
Fungicida*	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C.V	22,21	21,80	19,17	18,29	20,22

Médias seguidas por asterisco diferem do tratamento fungicida (*) pelo teste de Dunnett ao nível de 5% de probabilidade;

* Carboxin + Thiram (200 g L⁻¹ + 200 g L⁻¹)

Novamente com exceção do *Penicillium* sp. e *Rhizopus* sp., para os demais gêneros fúngicos, o OEM foi tão eficiente quanto o fungicida para *A. flavus*, *Alternaria* sp. e *Fusarium* sp., a partir da dose contendo 0,4% de OEM.

Deste modo, o OEM foi promissor na redução da incidência de determinados gêneros fúngicos, propondo ser, portanto, uma alternativa a ser adicionada no manejo de doenças transmitidas pela semente.

Os gêneros *A. niger* e *A. ochraceus* não foram apresentados nas tabelas 2 e 3, uma vez que as médias estimadas apresentaram baixa eficácia entre os tratamentos utilizados para o método *blotter test*.

3.3 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE FUNGICIDA DO ÓLEO ESSENCIAL DE MORINGA

O efeito do óleo essencial de moringa sobre a germinação de esporos fúngicos obteve resposta linear para o gênero *Rhizopus* sp., e quadrática para *Aspergillus flavus* e *Aspergillus niger*, conforme indica a figura 1.

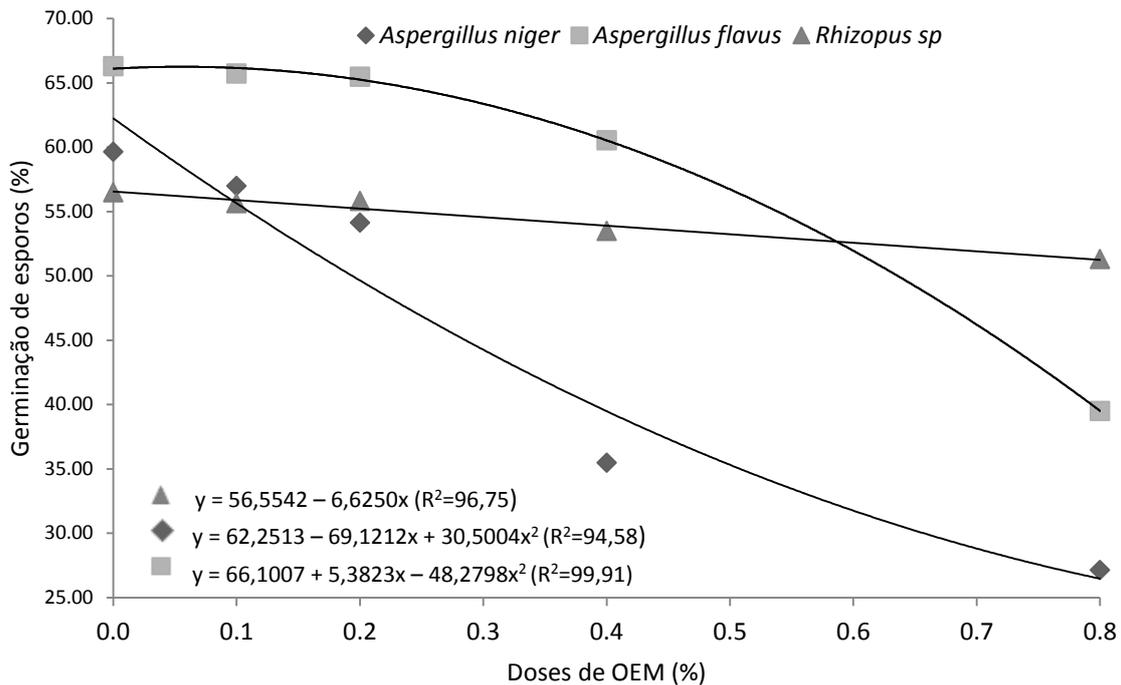


Figura 1 - Inibição da germinação de esporos de *Rhizopus sp.*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus niger* tratados com diferentes doses de óleo essencial de moringa (OEM). Para *Aspergillus* os valores foram transformados por arco seno $\sqrt{x} / 100$.

Observa-se redução na germinação de esporos de *Rhizopus sp.*, à medida em que doses crescentes de OEM são utilizadas. Por sua vez, para *A. niger*, a mínima germinação de esporos (23%) foi obtida com 1,13% de OEM, enquanto que para *A. flavus*, 0,05% de OEM (máximo da função) resultou em germinação estimada em 66,24%.

O efeito da moringa contra os gêneros *A. niger* e *A. flavus* também foi observado por Moyo et al. (2012) e Jamil et al. (2010), assim como, Jabeen et al. (2008), observaram efeito sobre *Rhizopus solani*. No entanto, os autores utilizaram extratos aquosos, com acetona e ainda extratos preparados a partir da semente da moringa.

Vale salientar que na composição química do OEM obteve-se mais de 21% de ácido hexadecanóico, um tipo de ácido carboxílico. Este por sua vez, é citado por como potente fungicida. Além disso, os monoterpenos têm capacidade de alterar a integridade e funcionamento das membranas através da perda de material citoplasmático e inibição da cadeia respiratória, bem como, interferir na expressão

de genes codificadores de fatores de virulência quando consideradas linhagens de micro-organismos produtores de enteroxinas (QIU et al., 2011), explicando portanto, a resposta obtida do OEM para os gêneros estudados.

A germinação de esporos de *A. ochraceus* apresentou comportamento quadrático à medida em que as concentrações do OEM se elevaram. A mínima germinação estimada foi obtida na concentração de 0,48%, com 15,68% de germinação estimada (Figura 2).

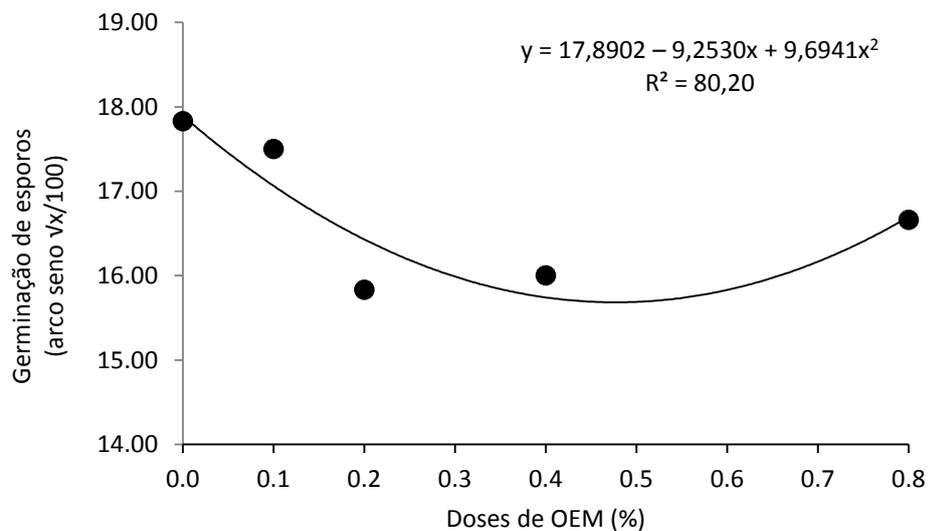


Figura 2 - Inibição da germinação de esporos de *Aspergillus ochraceus* tratados com diferentes doses de óleo essencial de moringa (OEM). Valores transformados por arco seno $\sqrt{x}/100$.

Muito embora tenha ocorrido aumento na germinação de esporos com a dose correspondente a 0,8% de OEM, este percentual estimado ainda se manteve abaixo da germinação estimada obtida no tratamento testemunha.

A atividade da moringa sobre *A. ochraceus* foi relatada por Rahman, Zerín e Anwar (2008), cujo trabalho foi realizado utilizando-se extratos de clorofórmio e acetato de etila contendo partes do caule da moringa.

Para o gênero *Fusarium* sp., a regressão apresentou-se de forma linear decrescente, sendo que o resultado mais significativo, com menor germinação de esporos, foi a maior concentração do OEM (Figura 3).

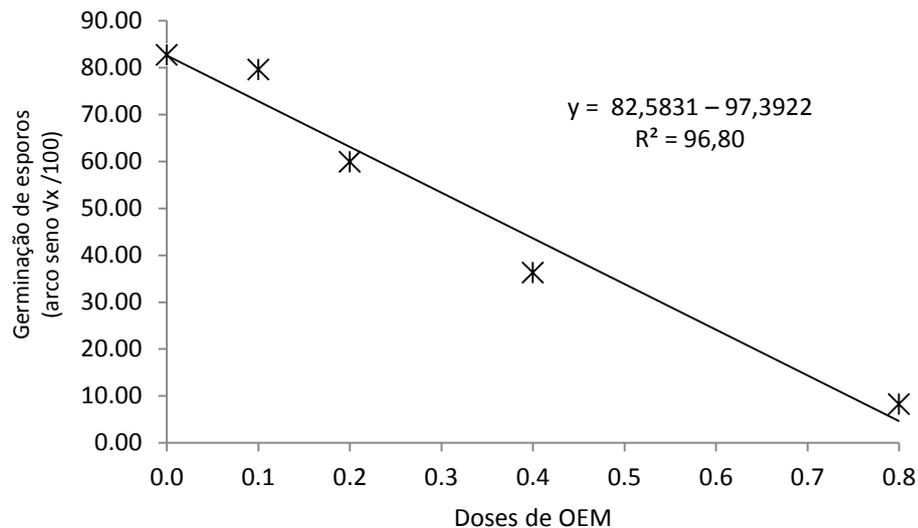


Figura 3 - Inibição da germinação de esporos de *Fusarium* sp. tratados com diferentes doses de óleo essencial de moringa (OEM). Valores transformados por arco seno $\sqrt{x} / 100$.

O linalol presente no OEM foi citado por Lacerda et al. (2014) como potente fungicida contra *Fusarium* sp., corroborando com os resultados obtidos neste experimento. Do mesmo modo, o efeito da moringa contra este gênero fúngico foi citado na literatura por Sayeed et al., (2012) ao utilizarem extrato metanólico da moringa na doses equivalentes a 30 μ g, 50 μ g e 100 μ g.

A ação do timol, um tipo de monoterpeneo presente no OEM também pode explicar a ação do óleo essencial sobre o fungo, tendo em vista que, segundo Zambonelli et al. (1996) pode ocorrer degeneração das hifas e liberação do conteúdo celular em contato com este composto e, muito embora não totalmente elucidado, o mecanismo molecular da ação do OEM pode estar relacionado à inibição de ATP a partir de dextrose (GILL et al., 2004).

O modelo raiz quadrada ajustou-se à germinação de esporos de *Alternaria* sp. ($R^2=99,03$) e *Penicillium* sp. ($R^2=80,29$).

Para *Alternaria* sp., (Figura 4-A) o máximo da função estimada (83,62%) foi obtido com 0,03% de OEM, enquanto que para *Penicillium* sp. (Figura 4-B), a partir da dose contendo 0,36% de OEM e germinação de 54,67% houve significativa redução no número de esporos germinados.

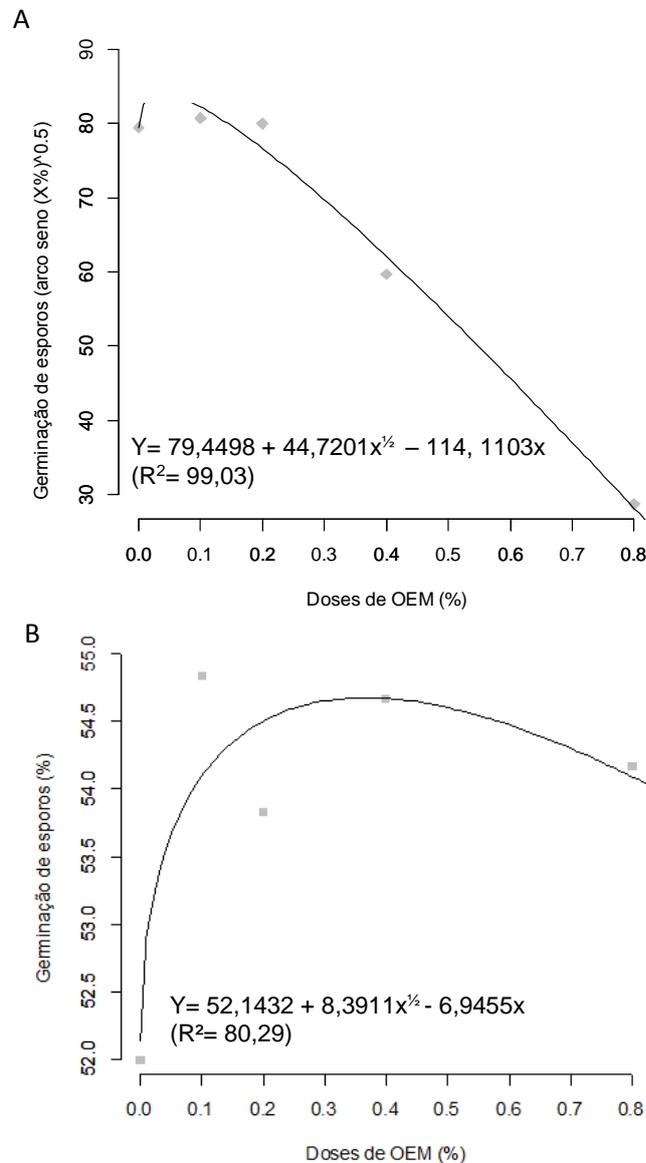


Figura 4 - Inibição da germinação de esporos de *Alternaria* sp. (A) e *Penicillium* sp. (B) tratados com diferentes doses de óleo essencial de moringa (OEM). Para *Alternaria* sp. Os valores foram transformados por arco seno (%X)^{0,5}.

O efeito do óleo essencial da moringa sobre o gênero *Penicillium* sp. foi relatado por Oluduro (2012) ao utilizar o extrato metanólico das folhas da planta, assim como Ayanbimpe et al. (2009) ao fazerem uso de extrato aquoso do vegetal. Para o fungo *Alternaria* sp., Mohamed e Abdallah (2014) observaram que o extrato obtido das sementes da moringa na concentração de 2% reduziu cerca de 86% da germinação dos esporos deste gênero.

Observa-se ainda, que o OEM apresentou efeito fungicida mais pronunciado contra *Alternaria* sp., evidenciando que um mesmo óleo pode ser ativo contra um

amplo espectro de espécies de micro-organismos, porém as concentrações mínimas inibitórias (CMI) podem variar (ANTUNES; CAVACOB, 2010).

Na comparação do efeito do OEM com o fungicida sobre a germinação de esporos, observa-se que para todos os gêneros investigados, o óleo essencial foi estatisticamente diferente em todas as doses avaliadas, conforme é possível observar a tabela 4.

Tabela 4 – Porcentagem de germinação de esporos fúngicos tratados com óleo essencial de moringa (OEM). Valores transformados por $\sqrt{(x+1)}$

Tratamentos	Fungos						
	<i>A. flavus</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. ochraceus</i>	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Alternaria</i> sp.	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Rhizopus</i> sp.
OEM (%)							
0	66,30*	59,66*	17,83*	82,74*	79,43*	52,00*	56,50*
0,1	65,74*	57,00*	17,50*	79,59*	80,68*	54,83*	55,66*
0,2	65,48*	54,16*	15,83*	59,93*	79,98*	53,83*	55,83*
0,4	60,55*	35,50*	16,00*	36,30*	59,69*	54,66*	53,50*
0,8	39,50*	27,16*	16,66*	8,29*	28,70*	54,16*	51,33*
Fungicida*	00,00	00,00	00,00	00,00	00,00	00,00	00,00
C.V	22,21	17,03	21,80	19,21	19,17	18,29	20,22

Médias seguidas por asterisco diferem do tratamento fungicida (*) pelo teste de Dunnett ao nível de 5% de probabilidade;

* Carboxin + Thiram (200 g L⁻¹ + 200 g L⁻¹)

Este resultado permite inferir que o fungicida sintético não pode ser substituído pelo OEM, tendo em vista os resultados obtidos na germinação de esporos. No entanto, este é capaz de promover reduções na germinação dos esporos fúngicos estudados, podendo, portanto, ser utilizado como complemento à outras medidas sanitárias na cultura do feijoeiro.

No contexto das pesquisas de novos produtos com potencial antifúngico, o interesse em produtos oriundos de plantas tem crescido, em especial, pela possibilidade de isolar substâncias conhecidas ou inéditas e, mais ainda, pela perspectiva de utilizá-las como modelos para moléculas sintéticas (DI SALVO 1994).

3.4 AVALIAÇÃO IN VITRO DA ATIVIDADE BACTERICIDA DO ÓLEO ESSENCIAL DE MORINGA

A curva de crescimento bacteriano do isolado de Xap é apresentado na Figura 5. O comportamento da concentração bacteriana em relação à absorbância foi linear crescente.

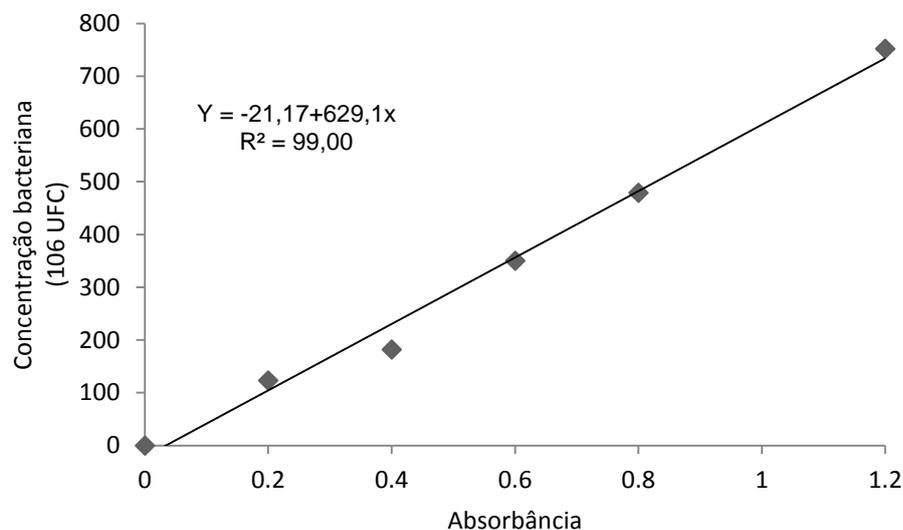


Figura 5 - Ajuste da curva de concentração bacteriana (em unidades formadoras de colônia – UFC) em função da absorbância a 580 nm.

O efeito do OEM sobre as bactérias é apresentado na figura 6, cujo ajuste foi obtido por meio de modelo raiz quadrada. O ponto de máxima foi obtida com 1,89% de OEM, cujos valores estimados resultaram em 2.357,41 UFCs. Enfatiza-se ainda, que houve redução significativa no número de unidades formadoras de colônias de Xap a partir do ponto de máxima função estabelecida.

Dentre os efeitos observados dos óleos essenciais nas bactérias, estão a alteração da permeabilidade seletiva da membrana, com colapso da bomba de prótons, clivagem de macromoléculas e coagulação citoplasmática (SOLOMAKOS et al., 2008).

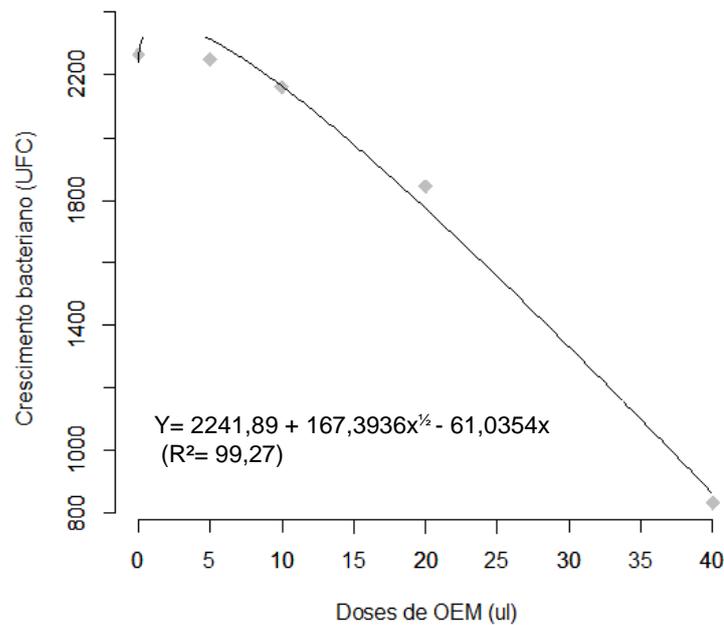


Figura 6 - Efeito das diferentes doses de óleo essencial de moringa (OEM) sobre a multiplicação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (UFC: unidades formadoras de colônia).

O efeito da moringa sobre o gênero *Xanthomonas* é citado na literatura por Shehu et al. (2013) ao constatarem eficiência do extrato etanólico em diferentes concentrações (5, 10 e 20 mg mL⁻¹) contra *Xanthomonas oryzae*.

Tabela 5 – Número de unidades formadoras de colônias (UFCs) em função do tratamento com diferentes doses de óleo essencial de moringa (OEM).

Tratamentos	UFCmL ⁻¹
Óleo essencial de moringa (%)	
0	2262,89*
0,1	2247,61*
0,2	2161,74*
0,4	1844,54*
0,8	834,72*
Bactericida*	0,00
C.V	7,19

Médias seguidas por asterisco diferem do tratamento fungicida (*) pelo teste de Dunnett ao nível de 5% de probabilidade;

* Hidróxido de Cobre (538 g Kg⁻¹)

Na comparação entre o efeito das diferentes doses de OEM e o bactericida (Tabela 5), observa-se que nenhuma das doses utilizadas foi estatisticamente igual ao tratamento sintético, cujo efeito antibiótico foi superior. No entanto, houve uma redução de cerca de 64% no número de UFCs ao se comparar o tratamento contendo 0,8% de OEM ao tratamento testemunha.

4 CONCLUSÕES

Embora não se equiparem ao efeito do fungicida, doses maiores que 0,4% de OEM reduzem a incidência de *A. flavus*, *Fusarium* sp. e *Alternaria* sp. em sementes de feijão, apresentando-se como alternativa a ser utilizada no manejo de doenças fúngicas transmitidas por semente

As doses crescentes de OEM reduziram a germinação de esporos de *Rhizopus* sp. e *Fusarium* sp.

A dose contendo 0,8% de OEM reduziu em 64% o número de UFCs para Xap, no entanto, as doses foram inferiores ao bactericida sintético.

REFERÊNCIAS

ABRANTES, F. A.; SÁ, M. E.; SOUZA, L. C. D.; SILVA, M. P.; SIMIDU, H. M.; ANDREOTTI, M.; BUZETTI, S.; VALÉRIO FILHO, W. V.; ARRUDA, N. Uso do regulador de crescimento em cultivares de feijão de inverno. **Pesquisa Agropecuaria Tropical**, v.42, n.21, p.148-154, 2011.

ANTUNES, M.D.C.; CAVACOB, A.; The use of essential oils for postharvest decay control. A review. **Flavour Fragrance Journal**, v.25, n.4, p.351-366, 2010.

AYANBIMPE, G.M.; OJO, T.K.; AFOLABI, E.; OPARA, F.; ORSAAH, S.; OJERINDE, O.S. Evaluation of extracts of *Jatropha curcas* and *Moringa oleifera* in culture media for selective inhibition of saprophytic fungal contaminants. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v.23, n.4, p.161-164, 2009.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – a review. **Food and chemical toxicology**, v.46, n.5, p.446-475, 2008.

BARNETT, H.L.; HUNTER, B.B. **Illustrate genera of fungi imperfect.** New York: MacMillan Co. 1986, 218p.

BIANCHINI, A. MARINGONI, A.C.M.; CARNEIRO, S.M.T.P.G. **Manual de Fitopatologia**. Agrônômica Ceres, v.2, 663 p, 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA/ACS. 2013, 395p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. AGROFIT 2014: Sistema de informação. Brasília, 2014. Disponível em: <<http://agricultura.gov.br/agrofit>>. Acesso em: abr. 2014

BUKAR, A.; UBA, A.; OYEYI, T.I Antimicrobial profile of *Moringa oleifera* Lam. extracts against some food – borne microorganisms. **Bajopas**, v.3, n.1, p.43-48, 2010.

COMISSÃO TÉCNICA SUL-BRASILEIRA DE FEIJÃO. **Informações técnicas para o cultivo de feijão na Região Sul brasileira**. Empresa de Pesquisa e Extensão Rural de Santa Catarina - Florianópolis: Epagri, 2 ed. 2012. 157p. Disponível em: <http://www.epagri.sc.gov.br/wpcontent/uploads/2013/10/informacoes_tecnicas_cultivo_feijao.pdf> Acesso em 25 Ago 2014.

DI SALVO, A.S. Antifungal properties of a plant extrat. Source and expectrum of antimicrobial activity. **Mycopathologia**, v.54, n.2, p.215-219, 1994.

DONLI, P.; DAUDA, H. Valuation of aqueous Moringa seed extract as a seed treatment biofungicide for groundnuts. **Pest Management Science**, v.59, n.9, p.1060-1062, 2003.

GARCIA, R.A.; JULIATTI, F.C.; BARBOSA, K.A.G.;CASSEMIRO, T.A. Atividade antifúngica de óleo e extratos vegetais sobre *Sclerotinia sclerotiorum*. **Biociencia Journal**, v.28, n.1, p.48-57, 2012.

GILL, A.O.; HOLLEY, R.A. Mechanisms of bactericidal action of cinnamaldehyde against *Listeria monocytogenes* and of eugenol against *L. monocytogenes* and *Lactobacillus sakei*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, n.10, p.5750–5775, 2004.

GOULART, A.C.P. Tratamento de sementes com fungicidas: uma prática de baixo custo que previne grandes prejuízos. **Revista Cultivar Grandes Culturas**, v.4, n.135, p.22-25, 2010.

International Seed Testing Association –ISTA. **International Rules for Seed Testing**. Annexe to Chapter 7: Seed Health Testing Methods. 7-021: Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* on *Phaseolus vulgaris*. Bassersdorf, Switzerland 2012. <<http://www.seedtest.org/upload/cms/user/SH-07-021-2014.pdf>> 15 Abr. 2014.

JAEBEEN, R.; SHAHID, M.; JAMIL, A.; ASHRAF, M. Microscopic evaluation of the antimicrobial activity of seed extracts of *Moringa oleifera*. **Pakistan Journal of Botany**, v.40, n.4, p.1349-1358, 2008.

JAMIL, A.M.; KHAN, M.M.; ASHRAF, M. Screening of some medicinal plants for isolation of antifungal proteins and peptides. **Pakistan Journal of Botany**, v.39, n.1, p.211-221, 2010.

LACERDA, H.; FILHO, V.; EVERTON, P.; OLIVEIRA, R.; SOUZA, D.; COELHO, M.; SILVA, F.; BORGES, J. Atividade fungitóxica do óleo essencial de *Aniba duckei*. 54°. **Congresso Brasileiro de Química**, 2014, Natal Rio Grande do Norte.

MACHADO, J. C. **Tratamento de sementes no controle de doenças**. Lavras: LAPS/UFLA/FAEPE, 2000. 13p.

MARIANO, R. L. R.; ASSIS, S. M. P. **Quantificação de inóculo de bactérias fitopatogênicas**. In: MARIANO, R. L. R. (Coord.) Manual de Práticas em Fitobacteriologia. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2000b. p.49-52.

MENEZES V.O.; PEDROSO D.C.; DILL A.M.; SANTOS R.F.; MULLER J.; JUNGES E.; MUNIZ M.; BLUME E. Uso de extratos vegetais in vivo no controle de *Alternaria solani* e na produtividade do tomateiro. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v.4, n.7, p.1108-1112, 2009.

Ministério do Meio Ambiente: Agrotóxicos – Comitê técnico. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/seguranca-quimica/agrotoxicos>. Acesso em: 26 Jan 2015.

MOHAMED, R.; ABDALLA, A.M. Preliminary studies on response of *Moringa oleifera* plants to infection with some soil borne plant pathogenic fungi. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v.3, n.12, p.389-397, 2014.

MOYO, B.; OYEDEMI, S.; MASIKA, P.J.; MUCHENJE, V. Polyphenolic content and antioxidant properties of *Moringa oleifera* leaf extracts and enzymatic activity of liver from goats supplemented with *Moringa oleifera* leaves/sunflower seed cake. **Meat Science**, v.91, n.4, p.441-447, 2012.

OLUDURO, A.O. Evaluation of Antimicrobial properties and nutritional potentials of *Moringa oleifera* Lam. leaf in South-Western Nigeria. **Malaysian Journal of Microbiology**, v.8, n.2, p.59-67, 2012.

QIU, J.; ZHANG, X.; LUO, M.; LI, H.; DONG, J.; WANG, J.; LENG, B.; WANG, X.; FENQ, H.; REN, W.; DENG, X. Subinhibitory concentrations of perilla oil affect the expression of secreted virulence factor genes in *Staphylococcus aureus*. **Plos One**, v.6, n.1, p.143-148, 2011.

RAHMAN, M.D.; ZERIN, L.; ANWAR, M.N. Antibacterial and antifungal activity of *Moringa oleifera* stem bark. **Journal of Biological Sciences**, v.3, n.1, p.109-117, 2008.

ROMEIRO, R.S. **Preservação de bactérias fitopatogênicas**. In: Romeiro, R.S. (Ed.) Métodos em Bacteriologia de Plantas. Viçosa. UFV, p.87-96, 2001.

Sistema para Análises Estatísticas – SAEG. Versão 9.1: Fundação Arthur Bernardes - UFV - Viçosa, 2007.

SAYEED, M.A.; HOSSAIN, M.S.; CHOWDHURY, M.E.H.; HAQUE, M. In vitro antimicrobial activity of methanolic extract of *Moringa oleifera* Lam. fruits. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v.1, n. 4, p.94-98, 2012.

SILVA, G.C.; GOMES, D.P.; KRONKA, A.Z.; MORAES, M.H. Qualidade fisiológica e sanitária de sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) provenientes do estado de Goiás. **Semina: Ciências Agrárias**, v.29, n.1, p.29-34, 2008.

SILVA, R.A.C.; SOUZA, T.O.; DIAS, L.P.; ANDRADE, T.J.A.S. **Ação do extrato metanólico da *Moringa oleifera* sobre o crescimento micelial de fitopatógenos**. IV CONGRESSO DE PESQUISA E INOVAÇÃO DA REDE NORTE E NORDESTE DE INOVAÇÃO TECNOLÓGICA. Belém, PA, 2009.

SHEHU, K.; ADDULLAHI, A.; ABIALA, M. A.; ODEBODE, A. C. In vitro bioprospecting of Botanicals towards inhibition of microbial pathogens of rice (*Oryza sativa* L.). **World Applied Sciences Journal**, v.22, n.2, p. 227-232, fev, 2013.

SOLOMAKOS, N.; GOVARIS, A.; KOIDIS, P.; BOTSOGLOU, N. The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin and their combination against *Escherichia coli* O157:H7 in minced beef during refrigerated storage. **Meat Science**, v.80, n.2, p.159-166, 2008.

SPONCHIADO, J.; SOUZA, C.A.; CASA, R.T.; TORMEM, M.E. Qualidade sanitária de sementes de cultivares de aveia branca com e sem aplicação de fungicida. In: XXXIII Reunião da Comissão Brasileira de Pesquisa de Aveia, 33., 2013, Pelotas. **Anais...Pelotas: Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel**, 2013, p.123-127.

THOMASSHOW, L.S.; WELLER, D.M. Role of antibiotics and siderophores in biocontrol of take-all disease of wheat. **Plant and Soil**, v. 126, n.8, p.93-99, 1990.

TORRES, J.P.; SILVA JUNIOR, T.A.F.; MARINGONI, A.C. Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* in common bean seeds from the state of Paraná (Brazil). **Summa Phytopathologica**, v.35, n.2, p.136-139, 2009.

ZAMBONELLI, A.; ZECHINI D'AULERIO, A.; BIANCHI, A.; ALBASINI, A. Effect of essential oils on phytopathogenic fungi in vitro. **Journal of phytopathology**, v.144, n.9/10, p.491-494, 1996.

ARTIGO 3 DESEMPENHO FISIOLÓGICO E PADRÃO ELETROFORÉTICO DE ISOENZIMAS EM SEMENTES DE *Phaseolus vulgaris* L. TRATADAS COM ÓLEO ESSENCIAL DE *Moringa oleifera* Lam.

Resumo: Com este trabalho objetivou-se avaliar o efeito de diferentes doses de óleo essencial de *Moringa oleifera* (OEM) sobre o potencial fisiológico de sementes de feijão das cultivares IPR Campos Gerais e IPR Colibri. A obtenção do OEM ocorreu por meio da hidrodestilação das folhas da moringa em Clevenger e, a fim de identificar os constituintes químicos do OEM, utilizou-se cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. Os tratamentos consistiram em cinco doses de OEM, correspondentes a 0,0%; 0,1%; 0,2%; 0,4% e 0,8% (fator quantitativo), um bactericida e um fungicida (fator qualitativo). Avaliou-se a germinação, primeira contagem, IVG, emergência, IVE e a atividade de isoenzimas (esterase, álcool desidrogenase, superóxido dismutase e isocitrato liase). Para as doses de OEM, obteve-se equações de regressão e as médias do fator qualitativo foram comparadas ao óleo essencial pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade. A dose com 0,8% de OEM reduziu o potencial fisiológico das sementes da cultivar IPR Colibri e apresentou-se inferior ao bactericida e fungicida para IVG e primeira contagem. Para IPR Campos Gerais, a dose com 0,8% de OEM promoveu a germinação e mostrou-se superior ao bactericida para o percentual de germinação e primeira contagem. O ponto de máxima emergência e IVE foram obtidos com as doses 0,6% e 0,28% (IPR Campos Gerais) e, 0,38% e 0,2% (IPR Colibri). Os baixos valores de expressão de bandas para EST e ADH, relacionaram-se à maior germinabilidade das sementes e a maior expressão de SOD, associou-se à redução na germinação. Não foi possível relacionar a ICL ao potencial fisiológico das sementes de feijão.

Palavras-chave: feijão, germinação, qualidade de sementes

PHYSIOLOGICAL PERFORMANCE AND ELECTROPHORETIC PATTERN OF ISOENZYMES IN *Phaseolus vulgaris* L. SEEDS TREATED WITH ESSENTIAL OIL OF *Moringa oleifera* Lam.

Abstract: With this study evaluated the effect of different doses of essential oil of *Moringa oleifera* (EOM) on the physiological potential seeds of bean of IPR Campos Gerais and IPR Colibri cultivars. The EOM was obtained by hydrodistillation of Moringa leaves in Clevenger and identified the chemical constituents OEM, with gas chromatography coupled with mass spectrometry. The treatments consisted of five EOM doses, corresponding to 0.0%; 0.1%; 0.2%; 0.4% and 0.8% (quantitative factor), a bactericide and a fungicide (qualitative factor). We evaluated the germination, first count, IVG, emergency, IVE and isoenzyme activity (esterase, alcohol dehydrogenase, isocitrate lyase and superoxide dismutase). Were evaluated the germination, first count, IVG, emergency, IVE and isoenzyme activity (EST, ADH, SOD and ICL). For OEM doses, was obtained regression equations and the average qualitative factor was compared to essential oil by Dunnett test at 5% probability. The

dose with 0,8% OEM reduced the physiological potential of the seeds of the IPR Colibri cultivar and stood below the bactericide and fungicide for IVG and first count. For IPR Campos Gerais, the dose with 0,8% EOM promoted germination and was superior to the bactericide to the germination percentage and first count. The point of maximum emergence and IVE were obtained with doses of 0,6% and 0,28% (IPR Campos Gerais), and 0,38% to 0,2% (IPR Colibri). Low value expression of the bands for EST and ADH, were related to the higher seed germination and the greatest expression of SOD, was associated with a reduction in germination. Could not possible relate the ICL to physiological potential of bean seeds.

Key-words: bean, germination, quality seeds

1 INTRODUÇÃO

Além do importante papel na alimentação do brasileiro, o feijão é um dos produtos agrícolas de maior importância econômico-social, devido principalmente à mão-de-obra empregada durante o ciclo da cultura. No Paraná, maior produtor de feijão do país, as lavouras de primeira, segunda e terceira safras são cultivadas principalmente por pequenos e médios produtores, que demandam de mão-de-obra familiar e contratada (SEAB, 2012).

No entanto, o feijoeiro é suscetível a inúmeras doenças causadas por fungos, bactérias e vírus transmitidos interna e externamente à semente e que influenciarão diretamente na qualidade da semente, afetando a produtividade do feijoeiro, uma vez que há redução na germinação com perda de vigor das sementes e ocorrência de deterioração das mesmas (SILVA et al., 2008).

Neste contexto, a semente constitui-se um importante veículo de disseminação ou introdução de patógenos numa área e, portanto, é a estrutura apropriada para se submeter aos processos ou substâncias adequadas visando à preservação ou aprimoramento de seu desempenho (tratamento de sementes). Entretanto, os fungicidas e bactericidas atualmente disponíveis para o tratamento de sementes tem apresentado grandes problemas de contaminação ambiental e humana (PERES et al., 2005), e por serem sintéticos, seu uso é impedido no setor orgânico.

Portanto, faz-se necessário buscar meios sustentáveis para o controle de doenças nas mais diversas culturas, como extratos e óleos essenciais provenientes de plantas com propriedades fungicidas e bactericidas para controlar a microbiota fitopatogênica associada às sementes.

Dentre os vegetais com potencial para atuar como antimicrobiano está a moringa (*Moringa oleifera* Lamarck). Este vegetal exótico, originário da Índia chegou ao Brasil há cerca de quarenta anos e difundiu-se por todas as regiões, sendo capaz de sobreviver em solos pobres, requerendo o mínimo de atenção e manejo (MORTON, 1991).

Os óleos essenciais, extratos aquosos e extratos metanólicos da moringa têm demonstrado resultados positivos na eliminação de fitopatógenos (fungos e bactérias) em experimentos realizados em sua grande maioria *in vitro* (SILVA et al., 2009).

Além disso, a espécie tem sido amplamente estudada uma vez que seus diferentes subprodutos (vagens, folhas, flores e sementes) podem ser empregados na nutrição humana e animal, agricultura, farmacêutica, cosmética, alimentícia e até mesmo como biocombustível (LILLIEHÖÖK, 2005).

No entanto, apesar da comprovada atividade antimicrobiana de muitos óleos essenciais, estes também podem interferir na germinação das sementes por apresentarem atividade alelopática se utilizados como antimicrobianos no substrato de germinação ou no tratamento das sementes. Assim, para ser eficiente na eliminação de fitopatógenos veiculados pela semente, o óleo essencial deve apresentar efeito tóxico aos micro-organismos fitopatogênicos e não interferir negativamente no potencial fisiológico das sementes.

Além dos testes de germinação e vigor, o monitoramento das alterações na qualidade fisiológica de sementes é realizado também por meio da avaliação de variações bioquímicas nos perfis de proteínas e isoenzimas específicas por meio de eletroforese (CASTRO et al., 2011). As isoenzimas atuam com papel fundamental na identificação de processos fisiológicos que levam a compreensão da condição fisiológica das sementes, podendo ser utilizadas como marcadores moleculares para a elucidação dos eventos que ocorrem durante o processo de germinação e armazenamento (ALBUQUERQUE et al., 2009).

Deste modo, objetivou-se com este trabalho, avaliar a ação de diferentes doses de óleo essencial de moringa sobre o potencial fisiológico e a atividade de isoenzimas em sementes de feijão das cultivares IPR Campos Gerais e IPR Colibri, e comparar sua ação aos tratamentos sintéticos (fungicida e bactericida).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E PROCEDIMENTOS ESTATÍSTICOS

Na avaliação do percentual de germinação e primeira contagem de germinação das diferentes cultivares de feijão carioca, utilizou-se o DIC com 7 tratamentos (cultivares) e 8 repetições de cinquenta sementes por unidade experimental. Por sua vez, para os testes de tetrazólio e condutividade elétrica, utilizou-se 4 repetições de cinquenta sementes e 4 repetições de vinte e cinco sementes (BRASIL, 2009).

A normalidade e a homogeneidade dos erros experimentais foram verificadas por meio dos testes de Shapiro-Wilk e de Levene, respectivamente. A seguir, os dados foram submetidos à análise de variância e as médias obtidas foram comparadas ($P > 0,05$) pelo teste de Tukey.

Na avaliação da viabilidade e vigor das sementes de feijão das cultivares IPR Colibri e IPR Campos Gerais tratadas com OEM, utilizaram-se cinco tratamentos (0,0%; 0,1%; 0,2%; 0,4% e 0,8%) e 8 repetições de cinquenta sementes (BRASIL, 2009) por parcela, os quais foram distribuídos em DIC. Avaliou-se o percentual de germinação, a primeira contagem de germinação e o índice de velocidade de germinação. A % de germinação da cultivar IPR Colibri foi transformada ($\arcsin \sqrt{x} / 100$), assim como a primeira contagem de germinação ($\sqrt{x} + 0,5$). Por sua vez, para os parâmetros porcentagem de emergência e índice de velocidade de emergência, utilizou-se o DBC, com 4 repetições de cinquenta sementes por tratamento.

Os efeitos das doses de óleo essencial sobre as características foram avaliados por meio de equações de regressão, em que foram utilizados a significância dos parâmetros dos modelos, por meio do teste t, e o maior valor de coeficiente de determinação (R^2) para a seleção dos modelos que melhor se ajustaram aos dados médios das características.

As comparações de médias entre os tratamentos quantitativos (0,0%; 0,1%; 0,2%; 0,4% e 0,8%) contra o tratamento bactericida e o tratamento fungicida foram realizadas por meio de contrastes, utilizando-se do teste F. As comparações de médias envolvendo cada dose contra o tratamento bactericida e o tratamento fungicida foram realizadas mediante o teste de Dunnett.

O nível de 5% de significância foi adotado em todos os testes de hipóteses e as análises estatísticas foram feitas utilizando-se o Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas (SAEG, 2007).

2.2 POTENCIAL FISIOLÓGICO DAS CULTIVARES DE FEIJÃO

As sete cultivares de feijão do grupo comercial carioca (IAPAR 81, IPR Andorinha, IPR Campos Gerais, IPR Colibri, IPR Tangará, IPR Curió e IAPAR 139), categoria C2, foram obtidas no Instituto Agrônomo do Paraná – IAPAR e produzidas na safra de 2013.

Após o recebimento em setembro de 2013, as sementes tiveram seu teor de água inicial determinado pelo método padrão da estufa, a $105\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante 24 horas, com quatro amostras de 5 g (peso úmido), conforme a RAS (BRASIL, 2009).

A fim de padronizar o grau de umidade, as sementes foram secas em estufa com circulação de ar a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ até atingirem 12% de umidade (ANDRADE et al., 2006). Após a secagem, as sementes foram armazenadas em recipientes impermeáveis autoclavados em câmara fria ($15\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$, $55\% \pm 5\text{ U.R}$) na Estação Experimental de Horticultura e Controle Biológico, Professor Mario Cesar Lopes, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE, campus Marechal Cândido Rondon, permanecendo por um período de sete meses.

Após o armazenamento, as sementes das sete cultivares tiveram seu potencial fisiológico avaliado a fim de reunir informações sobre germinação (viabilidade) e o vigor das mesmas. Foram realizados ensaios para avaliação da porcentagem de germinação, primeira contagem de germinação, condutividade elétrica e teste de tetrazólio.

O teste de germinação foi realizado utilizando-se oito amostras de 50 sementes, com germinação em câmara do tipo B.O.D em temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ com fotoperíodo de 12 h/luz em papel germitest (BRASIL, 2009). A primeira contagem de germinação foi realizada conjuntamente com o teste de germinação e foram avaliadas as plântulas normais no quinto dia após a instalação do teste. Os resultados para germinação e primeira contagem de germinação foram expressos em porcentagem.

O teste de condutividade elétrica foi conduzido segundo a descrição de Vieira e Krzyzanowski (1999) e os resultados foram expressos em $\mu\text{S cm}^{-1}\text{g}^{-1}$. Para o teste

de tetrazólio, seguiu-se a metodologia da RAS (BRASIL, 2009).

2.3 TRATAMENTO DAS SEMENTES DE FEIJÃO COM ÓLEO ESSENCIAL DE MORINGA

A fim de receberem os diferentes tratamentos contendo doses de óleo essencial de moringa, selecionou-se duas cultivares de feijão que apresentaram diferentes potenciais fisiológicos, bem como, porcentagem similar (13%) de infecção por micro-organismos dos gêneros *Rhizopus* sp, *Penicillium* sp, *Fusarium* sp, *Alternaria* sp, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger*, e *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, justificando assim, a necessidade de tratamento das sementes para proteção contra fitopatógenos. Sendo portanto, as escolhidas as cultivares IPR Campos Gerais e IPR Colibri.

Para a obtenção do óleo essencial utilizou-se folhas jovens de moringa, pertencentes a 10 diferentes matrizes localizadas na cidade de Cascavel, PR. As folhas eram submetidas a um processo de hidrodestilação utilizando-se o extrator Clevenger com tempo total de extração de 4 horas.

Para a separação do óleo essencial da mistura conhecida como hidrolato, utilizou-se o funil de separação e o solvente n-hexano. Este por sua vez, era submetido à evaporação em banho-maria à 60 °C para obtenção do óleo essencial, cuja caracterização química foi realizada utilizando-se cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, no Instituto de Química da USP em junho de 2014.

Para o tratamento das sementes, preparou-se uma emulsão contendo água destilada esterilizada e Tween 80 (0,5%) nos volumes de 100; 99.995; 99.990; 99.980 e 99.960 mL, mais as doses 0µl, 50µl, 100µl, 200µl e 400µl de óleo essencial de moringa que equivaleram a 0; 0,1; 0,2; 0,4 e 0,8%. Os demais tratamentos consistiram no fungicida Vitavax Thiram 200 SC (Carboxin + Thiram: 200 g L⁻¹ + 200 g L⁻¹) e no bactericida Kocide WDG (Hidróxido de cobre: 538 g Kg⁻¹) (MAPA-AGROFIT, 2014).

As sementes e os tratamentos foram acondicionadas em sacos plásticos e submetidas à agitação manual por três minutos, em seguida foram deixadas para secar em temperatura ambiente e submetidas aos testes de vigor e viabilidade.

2.4 POTENCIAL FISIOLÓGICO DAS SEMENTES APÓS O TRATAMENTO COM ÓLEO ESSENCIAL

Os ensaios para avaliação do potencial fisiológico das sementes tratadas foram realizados em abril de 2014, no Laboratório de Biologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, *campus* Medianeira.

Na avaliação do índice de velocidade de germinação (IVG) adotou-se a metodologia de Maguire (1962).

A fim de determinar a emergência em campo e índice de velocidade de emergência (IVE), em Setembro de 2014 (período recomendado para a semeadura) utilizou-se 4 repetições de 50 sementes em cada tratamento descrito, semeadas em linhas de 1,2 m com espaçamento de 0,4 m entre linhas e quinze sementes por metro linear.

As contagens para determinação da porcentagem de emergência foram realizadas diariamente até os 15 dias após semeadura, sendo consideradas plântulas as que apresentaram cotilédones acima do solo, em posição aberta, liberando as folhas primárias (LUDWIG et al., 2008). O índice de velocidade de emergência (IVE) foi calculo conforme Maguire (1962).

2.5 ELETROFORESE DE ISOENZIMAS

A avaliação da atividade das enzimas esterase, superóxido-dismutase, álcool desidrogenase, isocitrato liase foi realizada no Laboratório Central de Sementes da Universidade Federal de Lavras – UFLA em junho de 2014.

As sementes tratadas de ambas as cultivares (IPR Colibri e IPR Campos Gerais) (50 sementes em cada tratamento) foram mantidas por 24 h em germinador à 25 °C com fotoperíodo de 12h/luz em rolos de papel germitest. Em seguida, foram trituradas em moedor elétrico na presença de nitrogênio líquido e do antioxidante Polivinil pirrolidone – PVP, conforme metodologia descrita por MUNIZ et al. (2007).

Foram utilizados 100 mg do triturado, onde foram adicionados 300 µl do tampão de extração Tris-HCl, 0,2 M, pH 8 e 0,1% de beta mercaptanol (MENEZES et al., 2008). As misturas foram agitadas em vortex e mantidas em freezer a -84 °C, sendo posteriormente centrifugadas a $g=21910,2$ por 30 minutos a 4 °C (MUNIZ et al., 2007).

A corrida eletroforética foi desenvolvida em géis de poliacrilamida a 7,5% (gel separador) e 4,5% (gel concentrador). O sistema tampão gel/eletrodo utilizado foi o Tris-HCl 0,2M pH 8. Foram aplicados 50 µl das amostras de feijão e as corridas foram efetuadas a 150V por 4 horas. Terminada a corrida, os géis foram revelados para os sistemas enzimáticos segundo metodologia de ALFENAS et al. (1996).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 POTENCIAL FISIOLÓGICO DAS CULTIVARES DE FEIJÃO

Dentre as cultivares estudadas, as cultivares IPR Colibri, IPR 81, IPR Andorinha e IPR Curió apresentaram maior vigor e viabilidade, em contraste com IPR Tangará, IPR Campos Gerais e IAPAR 139 que obtiveram os menores percentuais de germinação e vigor (Tabela 1).

Tabela 1 - Médias para porcentagem de germinação, primeira contagem de germinação (%), tetrazólio e condutividade elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$) de sementes de feijão armazenadas, de acordo com as cultivares.

Cultivar	% Germinação	Primeira contagem (%)	Tetrazólio	Condutividade elétrica
IAPAR 81	99,25 ^a	42,50 ^a	85,00 ^{ab}	90,86 ^c
IAPAR 139	81,50 ^{bc}	7,00 ^{bc}	89,00 ^{ab}	123,26 ^{ab}
IPR Colibri	100,00 ^a	39,50 ^a	89,50 ^a	88,73 ^c
IPR Campos Gerais	85,50 ^{bc}	0,50 ^c	89,75 ^a	91,91 ^c
IPR Tangará	77,00 ^c	7,50 ^{bc}	73,75 ^c	137,53 ^a
IPR Andorinha	92,00 ^{ab}	12,50 ^{bc}	90,75 ^a	103,01 ^c
IPR Curió	92,00 ^{ab}	22,50 ^{ab}	82,50 ^b	107,20 ^{bc}
C.V	5,53	48,74	3,37	8,25

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

A cultivar IPR Tangará, por sua vez, apresentou percentual de germinação considerado inferior ao exigido pelos padrões do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA para comercialização de sementes de feijão, que determina germinação mínima de 80% para sementes da categoria C2 (BRASIL-MAPA, 2013).

Na avaliação do potencial fisiológico das cultivares, o teste de condutividade elétrica demonstrou baixa condutividade em sementes de alto vigor (cultivares IPR Colibri e IAPAR 81) e alta condutividade, ou seja, maior saída de lixiviados em sementes de baixo vigor (cultivares Tangará e 139), revelando a intensidade de desorganização dos sistemas membranais das células, conforme citam Vieira e Krzyzanowski (1999).

A temperatura e a umidade relativa do ar do ambiente de armazenamento, bem como o uso de embalagens que não permitam trocas gasosas com o ambiente constituem-se importantes fatores na manutenção da qualidade fisiológica de sementes de feijão e, embora as sementes tenham sido armazenadas sob a mesma condição, foram produzidas em condições de campo diferentes e apresentam genótipos distintos, justificando assim as diferenças encontradas na tabela 1.

Deste modo, com base nas cultivares avaliadas, selecionou-se duas a fim de receberem o tratamento com diferentes doses de óleo essencial de moringa. Optou-se por selecionar uma cultivar de alto vigor e viabilidade (IPR Colibri) e uma com médio vigor e viabilidade (IPR Campos Gerais), bem como, pelo fato de ambas apresentarem porcentagem similar de infecção por fungos (13%) em teste de sanidade, justificando assim, o tratamento com óleo essencial.

3.2 GERMINAÇÃO E VIGOR DAS SEMENTES TRATADAS COM ÓLEO ESSENCIAL

A análise de regressão dos dados permitiu o ajuste da equação quadrática com ponto de máxima germinação (Figura 1) para ambas as cultivares de feijão.

Para a cultivar IPR Colibri, o ponto de máxima contendo 0,4% de OEM promoveu germinação estimada em 86,01%, e para a cultivar IPR Campos Gerais o ponto de máxima ocorreu com a dose contendo 0,8% de OEM, com 91,25% das sementes germinadas (máximo da função).

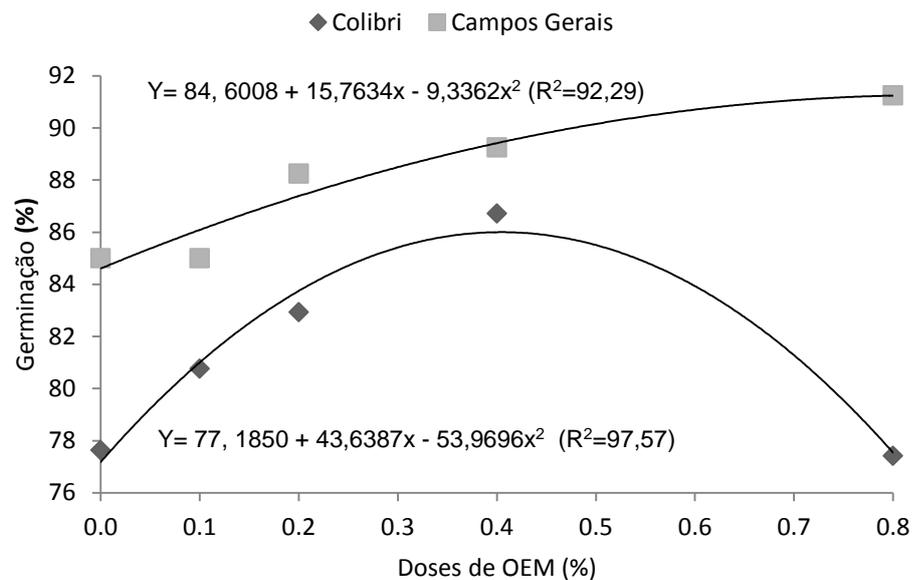


Figura 1 - Percentual de germinação de sementes de feijão das cultivares IPR Colibri (arco seno $\sqrt{x}/100$) e IPR Campos Gerais em função dos níveis de OEM.

As respostas observadas com estímulos ou reduções na germinação das sementes, em função das doses de OEM sugerem alelopatia, uma vez que esta é descrita como interações químicas tanto inibitórias quanto estimulatórias de uma planta sobre a outra, através de seus aleloquímicos (GRESSEL; HOLM, 1964).

Em altas proporções (valores acima de 60%) os terpenos, principais constituintes dos óleos essenciais, segundo Weidenhamer et al. (1993), são agentes potencialmente alelopáticos em função dos extensivos danos que podem causar às membranas celulares e ao processo respiratório, bem como, para Paudel e Gupta (2008), eles atuam na regulação de enzimas hidrolíticas essenciais para a ocorrência de germinação, demonstrando assim, que não basta somente a presença do composto, mas este deve estar em quantidade ideal para que possa ocasionar danos fisiológicos ou bioquímicos.

As alterações nos padrões de germinação das sementes em função do uso do óleo essencial refletem em modificações de rotas metabólicas inteiras e nos processos considerados importantes para o desenvolvimento do embrião, afetando diretamente sua ontogênese (FERREIRA; ÁQUILA, 2000). Estas alterações podem estar relacionadas com efeitos sobre a permeabilidade de membranas, transcrição e tradução de material genético, as reações enzimáticas e a respiração celular (RIZVI; RIZVI, 1992).

Embora tenha havido redução na germinação das sementes, a maior dose de OEM utilizada para a cultivar IPR Colibri resultou em percentual estimado próximo ao do tratamento testemunha. Esta pequena redução pode ter ocorrido porque a composição química do óleo essencial de moringa não indica grandes índices de atividade alelopática em função de ser constituído por pequena porcentagem de monoterpenos (3,77%) e sesquiterpenos (9,15%).

Dentre os monoterpenos, o linalol presente no óleo essencial de moringa foi citado por Rosado et al. (2009) como possível responsável pelo efeito fitotóxico observado em plântulas de tomate, alface e melissa, no entanto, este componente químico compunha mais de 78% do óleo essencial de *Ocimum basilicum*.

Observa-se ainda na Figura 1, que as cultivares estudadas apresentaram comportamento germinativo distinto frente ao OEM. Apesar disso, Mazzafera (2003) informa que o efeito dos aleloquímicos sobre as sementes poderia ocorrer afetando especialmente as menos vigorosas.

Enfatiza-se ainda que a resistência ou tolerância aos metabólitos presentes nos óleos essenciais é específica, existindo espécies menos ou mais sensíveis que outras, e neste caso, embora trabalhando com a mesma espécie, houve diferença na resposta entre as cultivares.

A análise de regressão dos dados para o índice de velocidade de germinação das sementes de feijão em função das doses de óleo essencial de moringa (Figura 2) propiciou resposta quadrática com ponto de máxima com 0,3% de OEM e IVG de 8,28 para cultivar IPR Colibri, e mínima resposta com 0,34% de OEM e IVG de 6,84 para a cultivar IPR Campos Gerais.

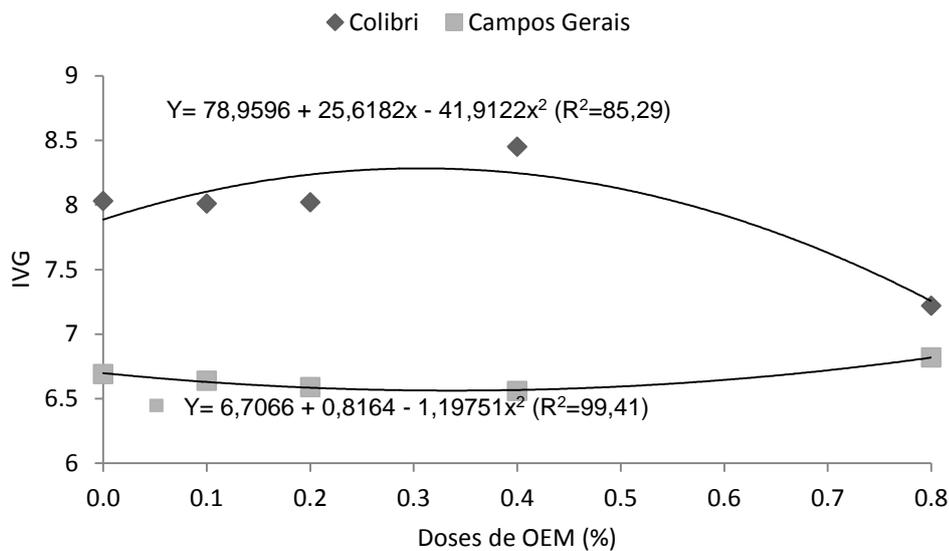


Figura 2 - Índice de velocidade de germinação de sementes de feijão das cultivares IPR Colibri e IPR Campos Gerais em função dos níveis de OEM.

Ferreira e Borghetti (2004) salientam que muitas vezes o aleloquímico do óleo essencial pode atuar sobre o vigor das sementes (a velocidade de germinação ou outro parâmetro) confirmando o resultado obtido neste experimento, onde observou-se redução no IVG das sementes da cultivar IPR Colibri em função da maior dose de óleo essencial utilizada (0,8%) cujo valor, esteve abaixo do observado para o tratamento testemunha.

Estudos mostram que o padrão de germinação pode ser modificado, verificando-se diferenças na velocidade e na sincronia da germinação de sementes submetidas aos compostos químicos presentes nos óleos essenciais (RANAL; SANTANA, 2006).

Ferreira e Áquila (2000) complementam sobre o efeito dos terpenos sobre a velocidade de germinação, citando que pode ocorrer um alongamento na curva de distribuição da germinação através do eixo do tempo, como o observado neste experimento.

Os dados oriundos da primeira contagem de germinação, expressos na figura 3, se ajustaram a um modelo linear para a cultivar IPR Campos Gerais e quadrático para IPR Colibri, com ponto de máxima em 0,27% de OEM e primeira contagem estimada em 0,82.

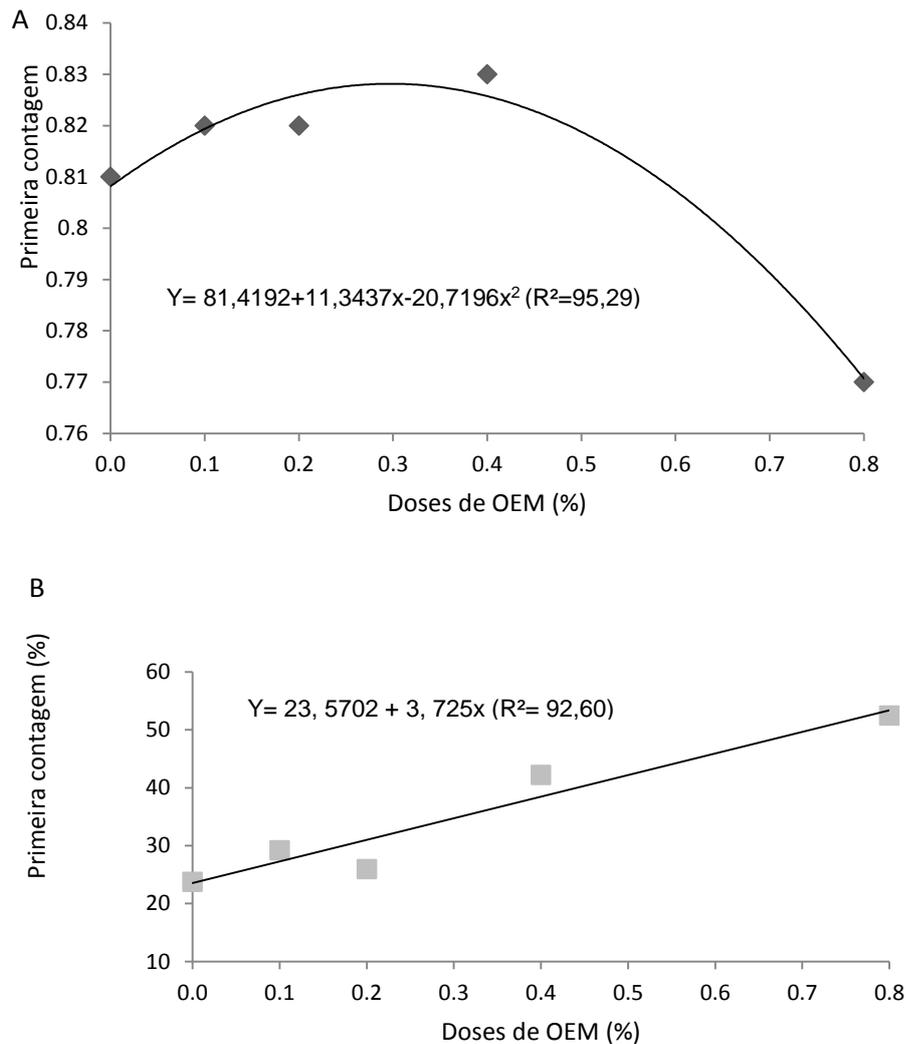


Figura 3 - Primeira contagem de germinação de sementes de feijão das cultivares IPR Colibri (A) ($\sqrt{x+0,5}$) e IPR Campos Gerais (B) em função dos níveis de OEM.

A tendência linear crescente observada na cultivar IPR Campos Gerais propõe incremento no vigor das sementes com as doses crescentes de OEM, fato este que pode estar relacionado à ação antimicrobiana do óleo essencial de moringa, visto que, a presença de patógenos nas sementes, afeta diretamente seu vigor, tendo em vista que destroem tecidos de reserva, afetam o transporte de água e danificam o sistema vascular (ZORATO; HENNING, 2001).

Vale ressaltar por sua vez, que a cultivar IPR Colibri apresentou comportamento diferente, uma vez que a maior dose de OEM utilizada (0,8%) promoveu média estimada inferior ao tratamento testemunha. Para Seigler (1996), as plantas podem ser seletivas em suas repostas quando submetidas à presença de aleloquímicos, sendo, portanto, difícil avaliar seu efeito nas diferentes espécies

vegetais.

A tabela 2 traz os resultados da comparação entre as médias oriundas das diferentes doses de OEM, fungicida e bactericida para as variáveis porcentagem de germinação, IVG e primeira contagem de germinação das sementes de feijão da cultivar IPR Campos Gerais.

Tabela 2 - Médias para porcentagem de germinação, IVG e primeira contagem de germinação de sementes de feijão da cultivar IPR Campos Gerais tratadas com diferentes doses de OEM, fungicida e bactericida.

Tratamento	% Germinação	IVG	Primeira contagem
0,0% OEM	85,00	6,69	23,75* **
0,1% OEM	85,00	6,64	29,25*
0,2% OEM	88,25	6,59	26,00* **
0,4% OEM	89,25 **	6,56	42,25
0,8% OEM	91,25 **	6,82	52,00 **
Fungicida	85,25	6,82	52,50
Bactericida	78,75	6,00	38,75

Médias seguidas por asterisco diferem do tratamento fungicida (*) e bactericida (**), pelo teste de Dunnett ao nível de 5% de probabilidade.

Somente a variável primeira contagem de germinação apresentou médias estatisticamente distintas ao tratamento fungicida. As doses 0,4% e 0,8% de OEM foram estatisticamente iguais ($P > 0,05$) ao fungicida, porém 0,0%, 0,1% e 0,2% de OEM resultaram em menores médias para primeira contagem de sementes da cultivar IPR Campos Gerais.

Segundo Bittencourt et al. (2007), o fungicida utilizado (Vitavax Thiran) confere proteção à semente contra os patógenos presentes no solo e na própria semente, bem como, pode aumentar a velocidade de emergência das plântulas, desde que, a baixa emergência seja causada por fungos.

Na comparação de médias entre o OEM e o bactericida, houve diferença estatística ($P > 0,05$) para as variáveis primeira contagem de germinação e % de germinação. Houve maior germinação com as doses 0,4% e 0,8% de OEM, assim como a dose contendo 0,8% promoveu maiores médias para a primeira contagem.

Moyo et al., (2012) descrevem o forte poder antioxidante dos extratos obtidos com folhas de moringa sobre a atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase e na redução da peroxidação de lipídios. Portanto, esta pode ser uma característica que explica o estímulo observado na viabilidade e no vigor das sementes tratadas com OEM, uma vez que este pode ter atuado impedindo eventos deteriorativos na semente.

Não houve diferença estatística entre as médias estimadas obtidas entre as doses de OEM, bactericida e fungicida no percentual de germinação das sementes de feijão da cultivar IPR Colibri (Tabela 3).

Tabela 3 - Médias para porcentagem de germinação, IVG e primeira contagem de germinação de sementes de feijão da cultivar IPR Colibri tratadas com diferentes doses de OEM, fungicida e bactericida.

Tratamento	% Germinação (arco seno $\sqrt{x} / 100$)	IVG	Primeira contagem $\sqrt{x} + 0,5$
0,0% OEM	77,64	8,03	0,81*
0,1% OEM	80,77	8,01	0,82*
0,2% OEM	82,93	8,02	0,82*
0,4% OEM	86,72	8,45	0,83*
0,8% OEM	77,42	7,22 *	0,77* **
Fungicida	80,24	8,34	0,90
Bactericida	81,81	7,94	0,83

Médias seguidas por asterisco diferem do tratamento Fungicida (*) e Bactericida (**), pelo teste de Dunnett ao nível de 5% de probabilidade.

Para o IVG, a dose contendo 0,8% de OEM promoveu menor velocidade de germinação quando comparada ao fungicida. Por sua vez, não houve diferença estatística ($P > 0,05$) entre as doses de OEM e o bactericida para esta mesma variável.

Para a primeira contagem de germinação, o fungicida foi capaz de promover maior percentual de médias estimadas quando comparado às doses de OEM, enquanto que ao se comparar com o bactericida, exceto para a dose contendo 0,8% de OEM, cuja média foi inferior, as demais apresentaram-se estatisticamente iguais.

Dentre os efeitos associados aos aleloquímicos, a desuniformidade da cultura

é citada por Da Silva et al. (2012), corroborando com os resultados observados neste experimento para as sementes da cultivar IPR Colibri.

No que se refere à porcentagem de emergência (Figura 4) o modelo quadrático ($R^2= 98,49$) explica melhor a variação encontrada no percentual de emergência à campo para sementes da cultivar IPR Campos Gerais, enquanto que, o modelo raiz quadrada ($R^2= 86,85$) melhor se ajustou ao comportamento das sementes da cultivar IPR Colibri.

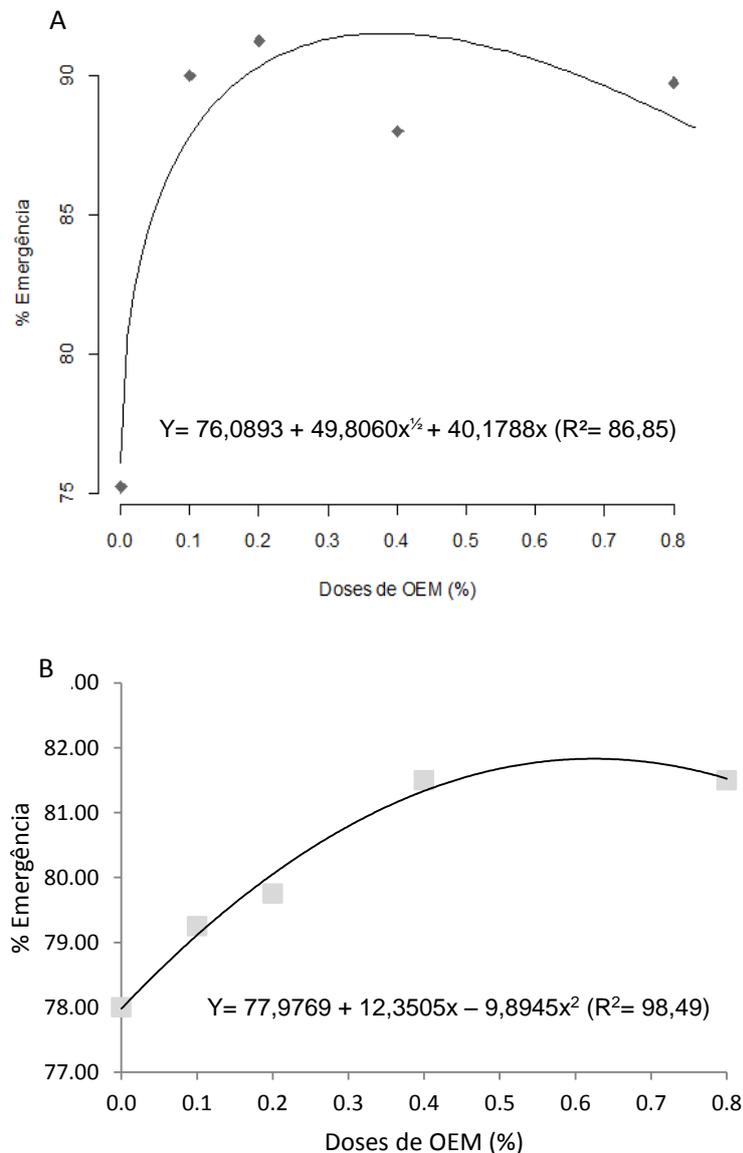


Figura 4 - Porcentagem de emergência de sementes de feijão das cultivares IPR Colibri (A) e IPR Campos Gerais (B) em função dos níveis de OEM.

O ponto de máxima emergência foi obtido com a dose equivalente a 0,62% de

OEM, com percentual de emergência de 81,83% para a cultivar IPR Campos Gerais.

Para a cultivar IPR Colibri, o ponto de mínima dose obtido a partir da equação de regressão foi com 0,38% de OEM com percentual de emergência de 83,6%. No entanto, observa-se que todas as doses de OEM utilizadas promoveram maior emergência do que o tratamento testemunha que não continha óleo essencial.

Este fato pode estar associado à ação antimicrobiana do óleo essencial, uma vez houve maior percentual de plântulas para sementes tratadas, tendo em vista que, quando o fungo é transmitido pela semente, muitas vezes ocorre apodrecimento da mesma antes mesmo da germinação.

Os resultados de emergência foram mais afetados em comparação aos dados de germinação obtidos em laboratório, o que se deve às condições favoráveis de laboratório, que além da germinação, podem ter favorecido a absorção e a translocação dos compostos presentes no óleo essencial.

França Neto e Henning (1984) complementam sobre a superioridade do teste de emergência à campo em relação aos ensaios de laboratório citando que a plântula ao emergir, libera o tegumento infectado por micro-organismos no solo, enquanto que, no teste de germinação em rolo de papel, o tegumento permanece associado aos cotilédones, e os patógenos, associados a ele causam deterioração na semente, justificando assim, as diferenças encontradas entre o teste de germinação e o de emergência.

O índice de velocidade de emergência das sementes de feijão das cultivares IPR Colibri e IPR Campos Gerais ajustou-se aos modelos quadrático e raiz quadrada, respectivamente, e são apresentados na Figura 5.

Para a cultivar IPR Campos Gerais, o ponto de máxima da função resultou em IVE de 7,57 com 0,28% de OEM. Para a cultivar IPR Colibri, o menor IVE (14,6) foi observado com 0,45% de OEM.

Rossetto et al. (1997) referiram-se à redução da velocidade de emergência, como consequência do baixo vigor associado à deterioração das sementes. Esta citação pode explicar a diferença obtida no IVE nos tratamentos com OEM se comparados com o tratamento testemunha.

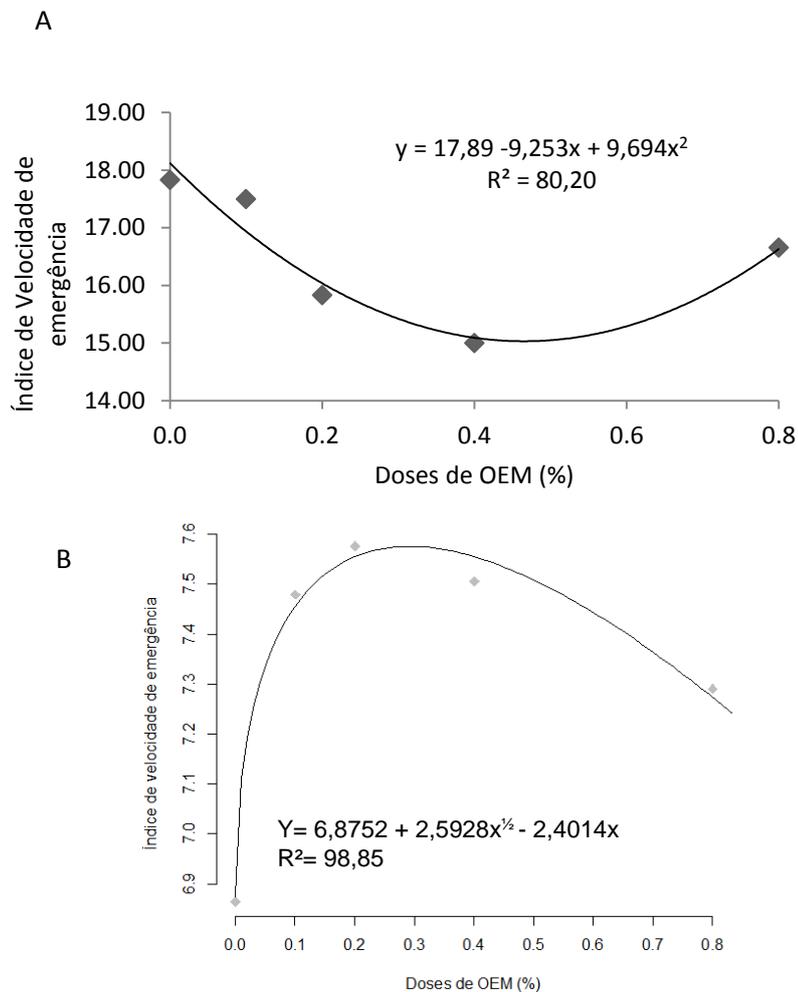


Figura 5 - Índice de velocidade de emergência de sementes de feijão das cultivares IPR Colibri (A) e IPR Campos Gerais (B) em função dos níveis de OEM.

Os resultados observados para porcentagem de emergência e IVE diferem dos obtidos na porcentagem de germinação e IVG, onde determinadas doses do óleo essencial de moringa foram responsáveis pelas menores médias. Segundo White et al. (1989), pode ser difícil caracterizar a alelopatia e seu verdadeiro impacto, a menos que fatores da planta, do solo e de micro-organismos sejam levados em consideração. Por essa razão, vários autores concordam que não se pode fazer extrapolação dos resultados encontrados em laboratório para o campo (SILVA et al., 2006).

A comparação entre as doses de OEM e os tratamentos sintéticos (fungicida e bactericida) sobre a porcentagem de emergência e IVE das sementes de feijão da cultivar IPR Colibri são apresentadas na tabela 4.

Tabela 4 - Médias para porcentagem de emergência e IVE de sementes de feijão da cultivar IPR Colibri tratadas com diferentes doses de OEM, fungicida e bactericida.

Tratamento	% emergência	IVE
0,0% OEM	75,25 *	6,58
0,1% OEM	90,00	7,65
0,2% OEM	91,25 **	7,93
0,4% OEM	88,00	7,22
0,8% OEM	89,75	7,85
Fungicida	93,25	7,64
Bactericida	79,00	7,10

Médias seguidas por asterisco diferem do tratamento Fungicida (*) e Bactericida (**), pelo teste de Dunnett ao nível de 5% de probabilidade.

As doses de OEM não diferiram estatisticamente ($P > 0,05$) do bactericida e do fungicida para o IVE das sementes. Destarte, houve diferença estatística para o percentual de emergência, onde é possível observar que o tratamento testemunha obteve o menor percentual em relação às demais doses de OEM e o fungicida. Do mesmo modo, a dose de contendo 0,2% de OEM promoveu maior velocidade de germinação no campo do que o bactericida Kocide WDG.

Para as demais doses de OEM em que não houve diferença estatística quanto aos tratamentos sintético, pode-se inferir que à campo os tratamentos foram igualmente eficientes na manutenção da viabilidade das sementes em condições reais, garantindo o estabelecimento da cultura do feijoeiro.

A tabela 5 apresenta as médias para % de emergência e IVE de sementes de feijão da cultivar IPR Campos Gerais após tratamento com doses de OEM, bactericida e fungicida.

Tabela 5 - Médias para porcentagem de emergência e IVE de sementes de feijão da cultivar IPR Campos Gerais tratadas com diferentes doses de OEM, fungicida e bactericida.

Tratamento	% emergência	IVE
0,0% OEM	78,00	6,86
0,1% OEM	79,25	7,47
0,2% OEM	79,75	7,57
0,4% OEM	81,50	7,50
0,8% OEM	81,50	7,29
Fungicida	84,50	7,54
Bactericida	80,50	7,17

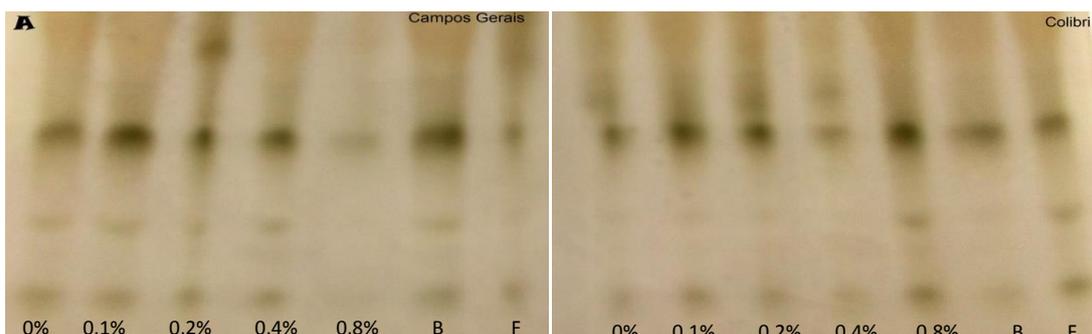
Médias seguidas por asterisco diferem do tratamento Fungicida (*) e Bactericida (**), pelo teste de Dunnett ao nível de 5% de probabilidade.

Os tratamentos com diferentes doses de OEM não diferiram significativamente ($P>0,05$) dos tratamentos com bactericida e fungicida para o percentual de emergência e IVE de sementes de feijão da cultivar IPR Campos Gerais, indicando que, para esta cultivar, os tratamentos podem ter impedido a perda de vigor decorrente da atividade microbiana, favorecendo assim o estabelecimento da cultura.

Possivelmente não houve diferença entre o tratamento testemunha e os demais tratamentos em função de ter havido maior interferência dos fatores como umidade, temperatura na emergência de plântulas e IVE em função do experimento ter sido conduzido à campo.

3.3 ELETROFORESE DE ISOENZIMAS

Os sistemas isoenzimáticos das sementes de feijão submetidas ao tratamento com diferentes doses de óleo essencial de moringa, fungicida e bactericida foram revelados para esterase (EST), isocitrato liase (ICL), álcool desidrogenase (ADH) e superóxido dismutase (SOD) são apresentados na Figura 6.



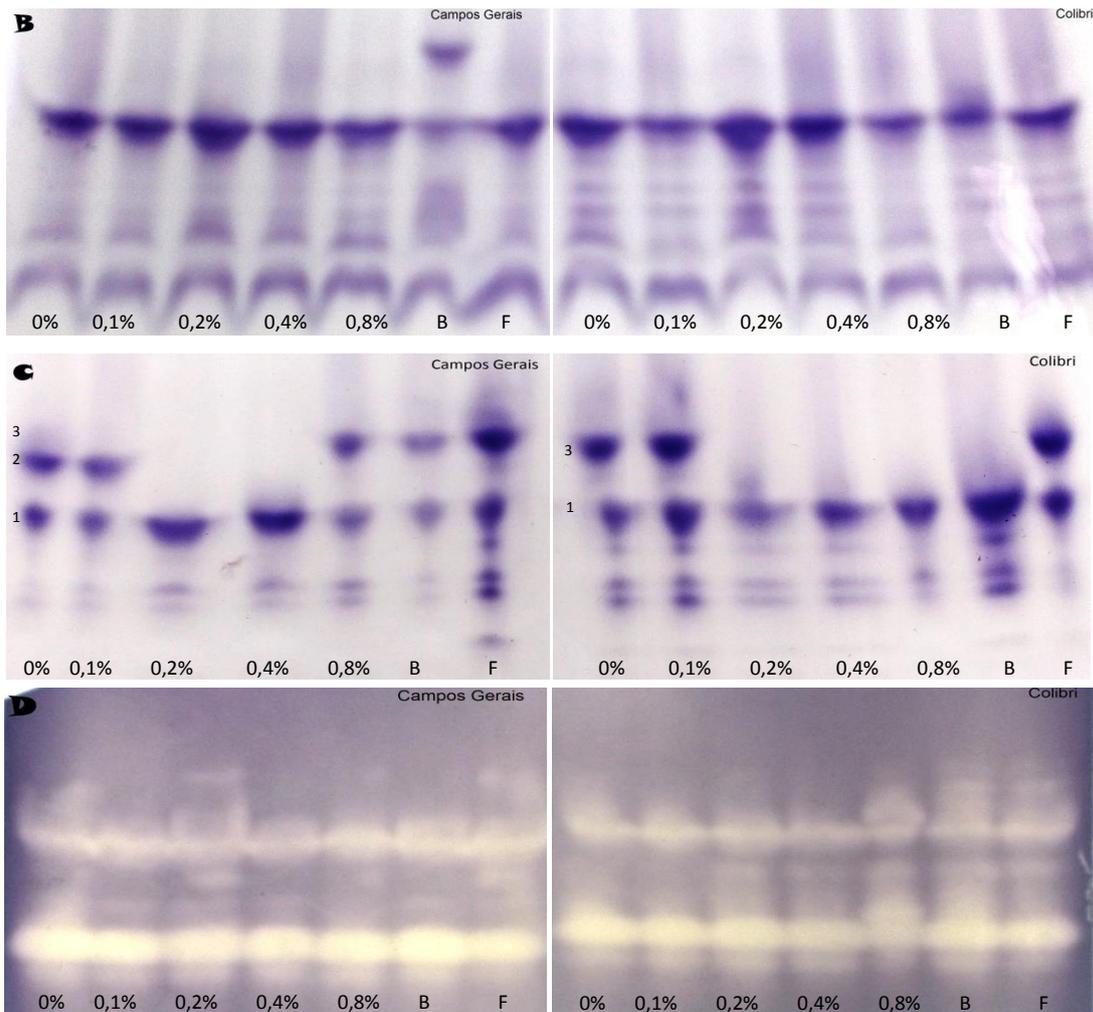


Figura 6 - Perfil eletroforético revelado em gel de poliacrilamida para isoenzimas: esterase (A), isocitrato liase (B), álcool desidrogenase (C), e superóxido dismutase (D) extraídas de sementes de feijão das cultivares IPR Campos Gerais e IPR Colibri tratadas com fungicida, bactericida e diferentes doses (0; 0,1; 0,2; 0,4 e 0,8%) de óleo essencial de moringa.

Pelo zimograma da enzima EST (Figura 3-A), foi possível observar menor valor de expressão nos tratamentos com 0,8% de OEM e fungicida para a cultivar IPR Campos Gerais, e nos tratamentos com bactericida, fungicida, 0,0% e 0,4% de OEM para a cultivar IPR Colibri.

Alterações nos padrões desta enzima são evidências da ocorrência de eventos deteriorativos, haja vista seu envolvimento em reações de hidrólise de ésteres e por estar diretamente ligada ao metabolismo de lipídios e ao processo degenerativo de membranas (SANTOS et al., 2004), podendo, portanto, sua baixa expressão levar à redução na germinação de sementes, segundo Basavarajappa, Shetty e Prakash (1991).

No entanto, ao avaliar o percentual de germinação das sementes tratadas com OEM (Figura 1), observa-se que as doses 0,8% de OEM para a cultivar IPR Campos Gerais e 0,4% de OEM para a cultivar IPR Colibri representam o ponto de máxima germinação em ambas as cultivares.

Este fato pode estar relacionado à ação antioxidante da moringa sobre as sementes, cuja peroxidação de lipídios pode ter sido menor. Esta atividade antioxidante foi observada por Sreelatha e Padma (2009) ao avaliarem o extrato aquoso das folhas da moringa e constataram forte efeito de inibição da peroxidação de lipídios.

Com relação à expressão da enzima ICL (Figura 6-B), observa-se menor valor de expressão nos tratamentos com bactericida e 0,8% de OEM para a cultivar IPR Campos Gerais e para os tratamentos bactericida, 0,1% e 0,8% de OEM para a cultivar IPR Colibri. Esta enzima, juntamente com a malato-sintetase está relacionada em leguminosas, à conversão de lipídios em carboidratos através do ciclo do glioxilato. Deste modo, a transformação de lipídios em sacarose pela enzima a torna importante nos processos germinativos (MAYER; POLJAKOFF-MAYBER, 1989).

Para Martins et al. (2000) a maior atividade desta enzima pode estar relacionada à sementes mais vigorosas, no entanto, isto não foi observado neste experimento, uma vez que, a primeira contagem de germinação e o IVG não foram maiores onde houve maior expressão da enzima.

Vale salientar que nem todas as isoenzimas investigadas se relacionam ao vigor ou viabilidade das sementes de feijão, e neste caso, a ICL não foi capaz de indicar alterações no potencial fisiológico das sementes de feijão após tratamento com OEM, bactericida e fungicida.

A ADH observada na figura 6-C, é uma enzima dimérica segundo Pasteur et al. (1988), que atua no processo respiratório removendo substâncias tóxicas às sementes, como o acetaldeído e etanol produzidos quando as células passam a respirar anaerobicamente (FARIA et al., 2003).

O sistema ADH para sementes da cultivar IPR Campos Gerais apresentou 3 bandas, distribuídas em três regiões de atividade e, tanto a intensidade quanto o número de bandas sofreram alterações em função do tratamento com óleo essencial, fungicida e bactericida.

A região 1 de menor massa molecular apresentou bandas em todos os tratamentos. No entanto, com 0,8% de OEM e bactericida, observa-se menor valor de expressão se comparados ao tratamento testemunha para a cultivar IPR Campos Gerais, que, por sua vez, juntamente com a menor dose de óleo essencial (0,1%) obtiveram duas bandas (regiões 1 e 2). A região 3, com bandas de maior massa molecular esteve presente apenas para os tratamentos com 0,8% de OEM, fungicida e bactericida.

Na cultivar IPR Colibri, observa-se a presença de bandas para ADH distribuídas em duas regiões (1 e 3) para os tratamentos testemunha, 0,1% de OEM e fungicida e, bandas em apenas uma região (1) para os tratamentos com 0,2%, 0,4% e 0,8% de OEM, variando em intensidade e diferenciando-se do tratamento testemunha. Os menores valores de expressão ocorreram nos tratamentos com 0,2% e 0,4% de OEM, indicando menor atividade da enzima em função do óleo essencial.

Tendo em vista sua função protetora contra o acetaldeído que acelera a deterioração das sementes, infere-se que a menor intensidade das bandas observadas nos tratamentos supracitados para ambas as cultivares podem estar relacionadas à menor atividade de respiração anaeróbica. Concomitantemente, dentre os tratamentos com OEM, as doses com 0,8% para a cultivar IPR Campos Gerais e 0,4% para IPR Colibri obtiveram os maiores percentuais de germinação (Figura 1).

Salienta-se que esta enzima é ativada quando a via aeróbica da respiração é comprometida, deste modo, houve menor intensidade de respiração anaeróbica nas sementes onde a expressão da ADH foi menor.

Tendo em vista que durante o processo germinativo, o metabolismo respiratório e a β -oxidação são as principais fontes de espécies reativas de oxigênio (EROs) devido ao fato de o vegetal não ser fotossinteticamente independente (Xi et al., 2010), observa-se pronunciada atividade da SOD (Figura 6-D) em todos os tratamentos, com pequeno incremento nas sementes oriundas do tratamento controle (0,0% de OEM) e bactericida (IPR Campos Gerais) e nas que receberam o bactericida e fungicida (IPR Colibri). Deste modo, menor atividade desta enzima foi observada nos tratamentos contendo óleo essencial de moringa para ambas as cultivares.

O óleo essencial de moringa pode ter atuado removendo radicais superóxido da semente, justificando assim, uma menor atividade enzimática nos tratamentos que o contém. A remoção de radicais superóxido e até mesmo de radicais de óxido nítrico foi observado por Sreelatha e Padma (2009) ao avaliarem o extrato aquoso das folhas de moringa.

Há que se considerar ainda, que os terpenóides presentes nos óleos essenciais também são citados por seus efeitos protetores, inibindo ou prevenindo efeitos deletérios provenientes do estresse oxidativo (CHANDRASEKHAR et al., 2006).

A pequena variação observada, por sua vez, pode estar relacionada ao fato desta enzima estar presente em organelas como mitocôndrias, além do citoplasma, conferindo estabilidade à enzima (NEWTON et al., 1999).

4 CONCLUSÕES

Tratamentos contendo 0,4% de OEM ou inferiores estimularam a germinação, a primeira contagem e o IVG de sementes da cultivar IPR Colibri. À campo, o máximo IVE foi obtido com 0,2% de OEM, e maior percentual de plântulas, com 0,38% de OEM.

Para a cultivar IPR Campos Gerais, a dose com 0,8% de OEM resultou em maior percentual de germinação. Doses crescentes de OEM promoveram incremento no IVG e, máxima emergência e IVE foram obtidos com 0,6% e 0,28% de OEM, respectivamente.

Houve modificações nas formas moleculares das isoenzimas EST e ADH cujos baixos valores de expressão das bandas se relacionaram à maior germinação. Comportamento inverso foi observado para SOD, com menor percentual de germinação relacionado à maiores valores de expressão nas bandas desta enzima.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, K.S.; GUIMARÃES, R.M.; ALMEIDA, I.F.; CLEMENTE, A.C.S. Alterações fisiológicas e bioquímicas durante a embebição de sementes de sucupira-preta (*Bowdichia virgilioides* Kunth). **Revista Brasileira de Sementes**, v.31, n.1, p.12-19, 2009.

ALFENAS, A.C. PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADOR, G.C. **Eletoforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa: UFV, 1996. 242 p.

ANDRADE, E.T.; CORREA, P.C.; TEIXEIRA, L.P.; PEREIRA, R.G.; CALOMENI, J.F. Cinética de secagem e qualidade de sementes de feijão. **Engevista**, v.8, n.2, p.83-95, 2006.

BASAVARAJAPPA, B.S.; SHETTY, H.S.; PRAKASH, H.S. Membrane deterioration and other biochemical changes associated with accelerated ageing of maize seeds. **Seed Science and Technology**, v.19, n.2, p.279-286, 1991.

BITTENCOURT, S.R.M.; MENTEN, J.O.M.; ARAKI, C.A.S.; MORAES, M.H.D.; RUGAI, A.R.; DIEGUEZ, M.J.; VIEIRA, R.D. Eficiência do fungicida carboxin + thiram no tratamento de sementes de amendoim. **Revista Brasileira de Sementes**, v.29, n.2, p.214-222, 2007.

BRASIL. Instrução normativa nº 9, de 2 de Junho de 2005. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 02 de Junho de 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA/ACS. 2009, 395p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. AGROFIT 2014: Sistema de informação. Brasília, 2014. Disponível em:< <http://agricultura.gov.br/agrofit>>. Acesso em: abr. 2014

CASTRO, M.B. **Avaliação da qualidade fisiológica de sementes de milho por meio da atividade respiratória**. 2011. 68 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

CHANDRASEKHAR, M.J.N.; PRAVEEN, B.; NANJAN, M.J.; SURESH, B. Chemoprotective effect of *Phyllanthus maderaspatensis* in modulating cisplatin-induced nephrotoxicity and genotoxicity. **Pharm Biol**, v.2, n.8, p.100–106, 2006.

DA SILVA, P.S.S.; FORTES, A.,M.T.; BIOAGO, N.P. PILLATI, D.M.; GOMES, F.M. Interação alelopática de *Jatropha curcas* L. com *Helianthus annuus* L. e *Zea mays* L. por meio de exsudados radiculares. **Biotemas**, v.25, n.3, p.57-64, 2012.

FARIA, L.C.; COSTA, J.G.C.; RAVA, C.A.; PELOSO, M.J.D.; MELO, L.C.; CARNEIRO, G.E.S.; SOARES, D.M.; DÍAZ, J.L.C.; ABREU, A.F.B.; FARIA, J.C.; SARTORATO, A.; SILVA, H.T.; BASSINELLO, P.Z.; ZIMMERMANN, F.J.P. BRS Requite: nova cultivar de feijoeiro comum de tipo de grão carioca com retardamento do escurecimento do grão. 1.ed. **Comunicado Técnico**, 65. Santo Antônio de Goiás, GO. EMBRAPA Arroz e Feijão. 2003.

FERREIRA, R. A.; DAVID, A.C.; MOTTA, M.S. Vigor and viability of *Senna multijuga*(Rich) e *Senna macranthera* (Collad.) seeds; a seed bank in soil salmon. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 26, n.1, p.33-43, 2004.

FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004, 323p.

FERREIRA, A. G.; AQUILA, M. E. A. Alelopatia: Área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, (Edição Especial), p.175-204, 2000.

FRANÇA NETO, J. B.; HENNING, A. A. **Qualidade fisiológica e sanitária de sementes de soja**. Londrina: EMBRAPA-CNPSo, 1984. 39p. (Circular Técnica, 9)

GRESSEL, J. B.; HOLM, L. G. Chemical inhibition of cropgermination by weed seed and the nature of the inhibition by Abutilon theophrasti. **Weed Research.**, v.4, n.17, p. 44-53, 1964.

LILLIEHÖÖK, H. **Use of Sand Filtration of River Water Flocculated with *Moringa oleifera***. 2005. 33 p. Master's Thesis (Department of Civil and Environmental Engineering, Division of Sanitary Engineering) - Lulea University of Technology, Lulea, 2005.

LUDWIG, M.P.; SCHUCH, L.O.B.; LUCCA FILHO, O.A.; AVELAR, S.A.G.; MIELERZKI, F.; OLIVO, M.; SEUS, R. Desempenho de plantas de feijão originadas de lotes de sementes com diferentes níveis de qualidade fisiológica. **Revista da FZVA**, v.15, n.2, p.44-52, 2008.

MAGUIRE, J.D. Speeds of germination-aid selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v.2, p.176-177, 1962.

MARTINS, C.A.O.; SEDIYAMA, C.S.; OLIVEIRA, M.G.; JOSÉ, I.C.; MOREIRA, M. I.; ROCHA, V.S. Atividade da isocitrato-liase durante a germinação de sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, v.22, n.1, p.42-46, 2000.

MAYER, A.M.; POLJAKOFF-MAYBER, A. **The germination of seeds**. 3.ed. N. York: Pergamon Press, 1989. 236p.

MAZZAFERA, P. Efeito alelopático do extrato alcoólico de cravo-da-índia e eugenol. **Revista Brasileira de Botânica**, v.26, n.2, p.231-238, 2003.

MENEZES, M.; VON PINHO, E.V.R.; PEREIRA, A.M.A.R.; OLIVEIRA, J.A. Identificação de cultivares de milho, feijão, algodão e soja por meio de enzimas e proteínas resistentes ao calor. **Revista Brasileira de Sementes**, v.30, n.2, p.111-122, 2008.

MORTON, J.F. The horseradish tree. *Moringa pterygosperma* (moringaceae): a boom to arid lands? **Economic Botany**, v.45.n.3, p.318-333, 1991.

MOYO, B.; OYEDEMI, S.; MASIKA, P.J.; MUCHENJE, V. Polyphenolic content and antioxidant properties of *Moringa oleifera* leaf extracts and enzymatic activity of liver from goats supplemented with *Moringa oleifera* leaves/sunflower seed cake. **Meat Science**, v.91, n.4, p.441-447, 2012.

MUNIZ, F.R.; CARDOSO, M.G.; VON PINHO, E.V.R.; VILELA, M. Qualidade fisiológica de sementes de milho, feijão, soja e alface na presença de extrato de tiririca. **Revista Brasileira de Sementes**, v.29, n.2, p.195-204, 2007.

NEWTON, A.C.; ALLNUTT, T.R. GILLIES, A.C.M.; LOWE, A. J.; ENNOS, R.A. Molecular phylogeography, intraspecific variation and the conservation of tree species. **Trends in Ecology and Evolution**, v.14, n.4, p.140-145, 1999.

PASTEUR, N.; PASTEUR, G.; BONHOME, F. **Practical isozyme genetics**. New York: Haslsted Press, 1988, 255p.

PAUDEL, V.R.; GUPTA, V.N.P. Effect of some essential oils on seed genotoxicated germination and seedling length of *Parthenium hysterophorous* L., **Ecoprint**, v.15, n.2, p.69-73, 2008.

PERES, F.; OLIVEIRA-SILVA, J.J.; DELLA-ROSA, H.V.; LUCCA, S.R. Desafios ao estudo da contaminação humana e ambiental por agrotóxicos. **Ciência e Saúde Coletiva**, v.10, n.4, p.27-37, 2005.

RANAL, M. A.; SANTANA, D. G. How and why to measure the germination process? **Revista Brasileira de Botânica**, v. 29, n. 1, p. 1-11, 2006.

RIZVI, S. J. N.; RIZVI, V. **Allelopathy: basic and applied aspects**. London: Chapman & Hall, 1992. 480 p.

ROSSETTO, C. A. V. et al. Efeito da disponibilidade hídrica do substrato, da qualidade fisiológica e do teor de água inicial das sementes de soja no processo de germinação. **Scientia Agricola**, v.54, n.01/02, p.97-105, 1997.

ROSADO, L.D.S.; RODRIGUES, H.C.A.; PINTO, J.E.B.P.; CUSTÓDIO, T.N.; PINTO, L.B.B.; BERTOLUCCI, S.K.V. Alelopatia do extrato aquoso e do óleo essencial de folhas do manjericão "Maria Bonita" na germinação de alface, tomate e melissa. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.11, n.4, p.422-428, 2009.

SAEG - **Sistema para Análises Estatísticas**, Versão 9.1: Fundação Arthur Bernardes - UFV - Viçosa, 2007.

SANTOS, C.M.R.; MENEZES, N.L.; VILLELA, F.A. Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de feijão envelhecidas artificialmente. **Revista Brasileira de Sementes**, v.26, n.1, p.110-119, 2004.

SECRETARIA DE ESTADO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO - SEAB. **Feijão: Análise da Conjuntura Agropecuária**, Outubro de 2012. Disponível em <http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/feijao_2012_13.pdf>. Acesso em 16 Jul 2013.

SEIGLER, D.S. Chemistry and mechanisms of allelopathy interactions. **Agronomy Journal**, v.88, n.4, p.876-885, 1996.

SILVA, W. A.; NOBRE, A. P; LEITES, A. P.; SILVA, M. S. C.; LUCAS, R. C.;

RODRIGUES, O. G. Efeito alelopático de extrato aquoso de *Amburana cearensis* Smith na germinação e crescimento de sementes de sorgo (*Sorghum bicolor* L.). **Agropecuária Científica no Semi-árido**, v.2, n.1, p.48-54, 2006.

SILVA, G.C.; GOMES, D.P.; KRONKA, A.Z.; MORAES, M.H. Qualidade fisiológica e sanitária de sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) provenientes do estado de Goiás. **Revista Semina**, v.29, n.1, p.29-34, 2008.

SILVA, R. A. C.; SOUZA, T. O.; DIAS, L.P.; ANDRADE, T. J. A. S. Ação do extrato metanólico da *Moringa oleifera* sobre o crescimento micelial de fitopatógenos. **IV congresso de pesquisa e inovação da rede norte e nordeste de educação tecnológica**. Belém, PA, 2009.

SREELATHA, S.; PADMA, P.R. Antioxidant activity and total phenolic content of *Moringa oleifera* leaves in two stages of maturity. **Plant Foods for Human Nutrition**, v.64, n.4, p-303-311, 2009.

VIEIRA, R.D.; KRZYZANOWSKI, F.C. Teste de condutividade elétrica. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA-NETO, J.B. (Ed.). Vigor de sementes: conceitos e testes. Londrina: **ABRATES**, cap.4, p.1-26, 1999.

WEIDENHAMER, J. D. et al. Just how insoluble are monoterpenes? **Journal of Chemistry Ecology**, v.19, n. 8, p.1799-1807, 1993.

WHITE, R. H.; WORSHAM, A. D.; BLUM, U. Allelopathic potencial of legume debris and aqueous extracts. **Weed Science**, v.37, p.674-679, 1989.

XI, Z.M.; ZHANG, Z.W.; CHENG, Y.F.; HUA, L. The effect of vineyard cover crop on main monomeric phenols of grape berry and wine in *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon. **Agricultural Sciences in China**, v.9, p.440-448, 2010.

ZORATO, M.F.; HENNING, A.A. Influência de tratamentos com fungicidas antecipados, aplicados em diferentes épocas de armazenamento, sobre a qualidade de sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 23, n.2, p.236-244, 2001.

CONCLUSÕES GERAIS

O óleo essencial das folhas de *Moringa oleifera* apresenta em sua composição química 87,08% de hidrocarbonetos e 12,92% de terpenos, cujos compostos são citados na literatura como potentes antimicrobianos. Constatou-se ainda, a capacidade de difusão do óleo essencial pelos tecidos da semente de feijão.

A dose contendo 0,8% de OEM reduziu o potencial fisiológico das sementes de feijão da cultivar IPR Colibri. Maiores médias para germinação, primeira contagem, IVG foram observadas com o uso de 0,4% de OEM ou doses inferiores a esta. À campo, o máximo IVE foi obtido com 0,2% de OEM, e maior percentual de sementes emergidas com 0,38% de OEM.

Maior percentual de germinação de sementes da cultivar IPR Campos Gerais foi observado com 0,8% de OEM e houve aumento no IVG com a maior dose de OEM utilizada. Máxima emergência e IVE foram obtidos com 0,6% e 0,28% de OEM, respectivamente.

Na dose contendo 0,4%, o óleo essencial de moringa foi estatisticamente igual ao fungicida Carboxin + Thiram, sobre a incidência de *A. flavus*, *Fusarium* sp. e *Alternaria* sp.

Na germinação de esporos de *Rhizopus* sp. e *Fusarium* sp. as doses crescentes se ajustaram ao modelo linear decrescente.

O efeito do óleo essencial sobre a *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* indicou que a dose contendo 0,8% de OEM possibilitou redução de 36% no número de UFCs ao se comparar com o tratamento testemunha, as doses apresentaram-se estatisticamente inferiores ao bactericida.

Os baixos valores de expressão de bandas para EST e ADH, relacionaram-se à maior germinabilidade das sementes e a maior expressão de SOD, associou-se à redução na germinação. Não foi possível relacionar a ICL ao potencial fisiológico das sementes de feijão.