

CÉSAR FERNANDES AQUINO

**AÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE *Colletotrichum gloeosporioides*
(Penz) DO MARACUJAZEIRO-AMARELO**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Ciências Agrárias do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Agrárias.

Orientadora: Prof.^a Nilza de Lima Pereira Sales.

Montes Claros

2011

Aquino, César Fernandes.

A657a Ação de óleos essenciais sobre *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz)
2011 do maracujazeiro-amarelo / César Fernandes Aquino. Montes Claros, MG:
ICA/UFMG, 2011.

80f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias, área de concentração em Agroecologia) Universidade Federal de Minas Gerais, 2011.

Orientadora: Prof.^a Nilza de Lima Pereira Sales.

Banca examinadora: Edson Hiydu Mizobutsi, Fernando da Silva Rocha, Ernane Ronie Martins, Nilza de Lima Pereira Sales.

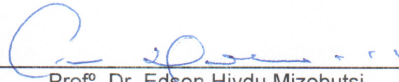
Inclui bibliografia: f. 68-80.

1. Fitopatologia - Ecologia. 2. Plantas medicinais - Maracujazeiro-amarelo.
3. Óleo essencial - *Colletotrichum gloeosporioides*. I. Sales, Nilza de Lima Pereira. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Agrárias. III. Título.

CDU:581.2

CÉSAR FERNANDES AQUINO

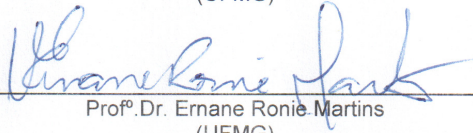
AÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE *Colletotrichum gloeosporioides*
(PENZ) DO MARACUJAZEIRO-AMARELO



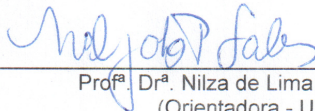
Prof^o. Dr. Edson Hydu Mizobutsi
(UNIMONTES)



Prof^o. Dr. Fernando da Silva Rocha
(UFMG)



Prof^o. Dr. Ernane Ronie Martins
(UFMG)



Prof^a. Dr^a. Nilza de Lima Pereira Sales
(Orientadora - UFMG)

Aprovada em 18 de Fevereiro de 2011

Montes Claros - MG

2011

DEDICO

A meus pais, José e Maria, e às minhas irmãs, Cássia e Flávia.

À minha namorada, Érica.

E aos meus amigos e colegas.

AGRADECIMENTOS

A Deus, a força e a fé nos momentos difíceis e também alegres.

À minha família (José, Maria, Cássia, Flávia) e à minha namorada Érica, que tornaram esse sonho possível.

À Universidade Federal de Minas Gerais.

À professora Nilza a orientação, a dedicação, a confiança, a amizade e o apoio incondicional.

Ao professor Flaviano, as análises cromatográficas e a paciência nas explicações sobre o assunto.

Ao professor Cândido, o auxílio nas análises estatísticas.

Ao professor Ernane Ronie Martins, a Coorientação.

Aos colegas de mestrado, Hugo César, Manoel, Diego e Héliida, a amizade.

Aos alunos da graduação, Eriksen, Raphael, a importante contribuição na realização desta pesquisa.

Aos professores e aos técnicos do Instituto de Ciências Agrárias da UFMG.

A CAPES, a concessão da bolsa de mestrado.

Às secretárias Priscila Gomes e Priscila Gonçalves, o excelente trabalho e a paciência com todos os alunos.

A todos aqueles que, de uma forma ou de outra, contribuíram para que esta pesquisa fosse concluída.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 2 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA E EFEITO ANTIFÚNGICO DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE TRÊS PLANTAS MEDICINAIS

FIGURA 1-	Perfis cromatográficos dos óleos essenciais. (A) <i>Lippia sidoides</i> , (B) <i>Cymbopogon citratus</i> e (C) <i>Ocimum gratissimum</i>	36
GRÁFICO 1-	Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) do <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> em função das concentrações dos óleos essenciais de <i>Lippia sidoides</i> , de <i>Cymbopogon citratus</i> e de <i>Ocimum gratissimum</i>	42
GRÁFICO 2-	Número de conídios/cm ² (x10 ⁴), produzidos nas colônias de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> em meio BDA com diferentes concentrações dos óleos essenciais de <i>Lippia sidoides</i> , de <i>Cymbopogon citratus</i> e de <i>Ocimum gratissimum</i>	44
GRÁFICO 3-	Porcentagem de conídios germinados do <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , em diferentes concentrações de óleos essenciais de <i>Lippia sidoides</i> , de <i>Cymbopogon citratus</i> e de <i>Ocimum gratissimum</i>	46

CAPÍTULO 3 - PATOGENICIDADE, MÉTODOS DE INOCULAÇÃO, E AÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS NO MANEJO DA ANTRACNOSE EM FRUTOS DE MARACUJAZEIRO-AMARELO

FIGURA 1-	Perfis cromatográficos dos óleos essenciais. (A) <i>Lippia sidoides</i> , (B) <i>Cymbopogon citratus</i> e (C) <i>Ocimum gratissimum</i>	64
GRÁFICO 1-	Diâmetro das lesões de antracnose em frutos de maracujazeiro-amarelo, em função das concentrações dos óleos essenciais de <i>Lippia sidoides</i> , <i>Cymbopogon citratus</i> e <i>Ocimum gratissimum</i>	61

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA E EFEITO ANTIFÚNGICO DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE TRÊS PLANTAS MEDICINAIS

- 1- Quantificação e identificação dos componentes químicos presentes nos óleos essenciais de *Lippia sidoides*, de *Cymbopogon citratus* e de *Ocimum gratissimum*..... 38
- 2- Índice de velocidade de crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*, em função das concentrações dos óleos essenciais de *Lippia sidoides*, de *Cymbopogon citratus* e de *Ocimum gratissimum*..... 40
- 3- Número médio de conídios/cm² ⁽¹⁾ de *Colletotrichum gloeosporioides* em meio BDA com diferentes concentrações dos óleos essenciais de *Lippia sidoides*, de *Cymbopogon citratus* e de *Ocimum gratissimum*..... 41
- 4- Percentagem de conídios germinados do *Colletotrichum gloeosporioides*, em função das concentrações dos óleos essenciais de *Lippia sidoides*, de *Cymbopogon citratus* e de *Ocimum gratissimum*..... 45

CAPÍTULO 3 - PATOGENICIDADE, MÉTODOS DE INOCULAÇÃO, E AÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS NO MANEJO DA ANTRACNOSE EM FRUTOS DE MARACUJAZEIRO-AMARELO

- 1- Médias dos diâmetros das lesões de antracnose em frutos maduros de maracujazeiro-amarelo, causadas pelos diferentes isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*..... 58
- 2- Médias dos diâmetros das lesões de antracnose em frutos de maracujazeiro-amarelo, resultantes da inoculação de *Colletotrichum gloeosporioides* em frutos com diferentes estádios de maturação, utilizando-se duas metodologias de inoculação..... 59
- 3- Quantificação e identificação dos componentes químicos presentes nos óleos essenciais de *Lippia sidoides*, de *Cymbopogon citratus* e de *Ocimum gratissimum* 65

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1 – REFERENCIAL TEÓRICO.....	10
1	INTRODUÇÃO.....	10
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	11
2.1	Maracujazeiro-amarelo (<i>Passiflora edulis</i> Sim. <i>F. flavicarpa</i> Degener).....	11
2.2	Antracnose do maracujazeiro-amarelo (<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>).....	13
2.3	Colheita e pós-colheita do maracujá.....	15
2.4	As plantas medicinais e a produção de óleo essencial.....	17
2.4.1	Alecrim-pimenta (<i>Lippia sidoides</i> Cham.).....	19
2.4.2	Capim-santo (<i>Cymbopogon citratus</i> (DC) Stapf.).....	19
2.4.3	Alfavaca-cravo (<i>Ocimum gratissimum</i> L.).....	20
2.5	Controle alternativo de doenças.....	20
2.6	Óleos essenciais no controle de fungos <i>in vitro</i>	23
2.7	Óleos essenciais no tratamento pós-colheita de frutos.....	25
3	OBJETIVO GERAL.....	26
	CAPÍTULO 2 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA E EFEITO ANTIFÚNGICO DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE TRÊS PLANTAS MEDICINAIS.....	27
	RESUMO.....	27
	ABSTRACT.....	28
1	INTRODUÇÃO.....	29
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	30
2.1	Análise cromatográfica dos óleos essenciais obtida das plantas (<i>Lippia sidoides</i> , <i>Cymbopogon citratus</i> e <i>Ocimum gratissimum</i>)....	31
2.2	Avaliação do crescimento micelial e produção de conídios de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> em diferentes concentrações os óleos essenciais	32
2.3	Avaliação dos óleos essenciais de diferentes plantas medicinais na germinação de conídios de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	33

3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
3.1	Análise cromatográfica dos óleos essenciais obtida das plantas (<i>Lippia sidoides</i> , <i>Cymbopogon citratus</i> e <i>Ocimum gratissimum</i>) ...	35
3.2	Avaliação do crescimento micelial e da produção de conídios de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> em diferentes concentrações de óleos essenciais.....	40
3.3	Avaliação dos óleos essenciais de diferentes plantas medicinais na germinação de conídios de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	45
4	CONCLUSÃO	48
	CAPÍTULO 3 - PATOGENICIDADE, MÉTODOS DE INOCULAÇÃO E AÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS NO MANEJO DA ANTRACNOSE, EM FRUTOS DE MARACUJAZEIRO-AMARELO	49
	RESUMO	49
	ABSTRACT	50
1	INTRODUÇÃO	51
2	MATERIAL E MÉTODOS	52
2.1	Patogenicidade de diferentes isolados de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> em frutos maduros de maracujazeiro-amarelo....	53
2.2	Métodos de inoculação de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , em frutos verdes e maduros.....	54
2.3	Avaliação de diferentes concentrações dos óleos essenciais no desenvolvimento da lesão de antracnose em maracujá-amarelo.....	55
2.4	Análise cromatográfica dos óleos essenciais obtida das plantas (<i>Lippia sidoides</i> , <i>Cymbopogon citratus</i> e <i>Ocimum gratissimum</i>)....	56
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
3.1	Patogenicidade de diferentes isolados de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> em frutos maduros de maracujazeiro-amarelo.....	57
3.2	Métodos de inoculação de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , em frutos verdes e maduros.....	59
3.3	Avaliação de diferentes concentrações dos óleos essenciais no desenvolvimento da lesão de antracnose em maracujá-amarelo.....	61

3.4	Análise cromatográfica dos óleos essenciais obtida das plantas (<i>Lippia sidoides</i> , <i>Cymbopogon citratus</i> e <i>Ocimum gratissimum</i>).....	63
4	CONCLUSÃO	67
	REFERÊNCIAS	68

CAPÍTULO 1 – REFERENCIAL TEÓRICO

1 INTRODUÇÃO

A cultura do maracujazeiro é muito importante na região Norte de Minas Gerais, por ser responsável pela agregação de renda para diversos agricultores familiares. Um dos principais entraves ao desenvolvimento dessa cultura é a ocorrência de doenças, entre elas, a antracnose causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (O.A.J. Penzig) O. A.J. Penzig & P.A. Saccardo) (Teleomorfo: *Glomerella cingulata* (B.M. Stoneman) P. Spauding & H. Von Schrenk. Em época quente e chuvosa, característica do verão nortemineiro e na ausência de controle efetivo, o patógeno causa intensa desfolha, seca de ramos e apodrecimento de frutos. Isso tem como consequência a redução da produtividade das plantas e a baixa qualidade dos frutos, causando grandes prejuízos aos produtores (LIBERATO, 2002).

Como a cultura do maracujazeiro apresenta considerável gama de doenças, os produtores acabam lançando mão do uso indiscriminado de fungicidas. De acordo com Ghini e Kimati (2000), isso tem causado, ao longo dos anos, danos ao meio ambiente e aos seres vivos e, tem favorecido a seleção de raças resistentes de patógenos a essas substâncias químicas. Segundo Campanhola e Bettiol (2003), para tentar amenizar esses problemas, deve-se buscar o controle alternativo de doenças. Dessa forma, os óleos essenciais podem ser utilizados tanto no controle direto do patógeno, quanto para a indução dos mecanismos de resistência. Assim, a exploração da atividade antimicrobiana de compostos secundários presentes nas plantas, pode se constituir em mais uma forma potencial de controle alternativo de doenças em plantas.

Pesquisas já foram realizadas, avaliando-se o efeito *in vitro* e *in vivo* de óleos essenciais de várias plantas, no controle de fungos fitopatogênicos, com resultados promissores (ANARUMA *et al.*, 2010; FRIAS; KOZUSNY-ANDREANI, 2009; MEDICE *et al.*, 2007; NASCIMENTO *et al.*, 2008; ÖZEK *et al.*, 2010; ROGNIER *et al.*, 2010; ROZWALKA *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2009; SOUZA JÚNIOR *et al.*, 2009; ZACARONI *et al.*, 2009;). Contudo, necessita-

se ainda de trabalhos que determinem qual a melhor concentração; quais compostos presentes nos óleos essenciais são mais eficientes no controle de fitopatógenos; o efeito residual dos óleos essenciais; qual dosagem provoca fitotoxidez. Além disso, estudos em condições de campo devem ser realizados para avaliar o efeito desses óleos direto nas plantas.

Dessa forma, objetivou-se, com esta pesquisa, investigar a composição química dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* Cham., de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. e de *Ocimum gratissimum* L.; avaliar o efeito *in vitro* desses óleos sobre o crescimento micelial, a produção e a germinação de conídios e a eficácia no controle do *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) em frutos de maracujazeiro-amarelo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* Sim. *F. flavicarpa* Degener)

O maracujazeiro-amarelo possui o seu centro de origem na América Tropical e Subtropical e, principalmente, no Brasil (FALEIRO *et al.*, 2005). É uma planta trepadeira robusta, que pode atingir de 5 a 10m de comprimento. O seu sistema radicular é do tipo axial, sendo o maior volume de raízes concentrado entre 15 e 45cm de profundidade. A planta apresenta folhas pecioladas, serreadas e glabras, flores de cor branca, com franja roxa, medindo cerca de 5cm de diâmetro (CARVALHO-OKANO; VIEIRA, 2001). O fruto é uma baga indeiscente e carnosa, de formato subgloboso ou ovoide (SALOMÃO *et al.*, 2001).

É uma planta de clima quente e úmido. Adapta-se bem em regiões de clima tropical e subtropical. A planta não resiste a geadas e não frutifica sob temperaturas baixas, tendo, assim, a temperatura ideal de 26°C, com precipitação pluviométrica ideal entre 1.200 a 1.400mm (RUGGIERO, 1998).

Pertence à família Passifloraceae, que é composta por 630 espécies distribuídas em 18 gêneros, sendo o gênero *Passiflora* o de maior expressividade (FALEIRO *et al.*, 2005). Estima-se que o gênero *Passiflora* seja composto de 465 espécies, das quais 150 a 200 são originárias do

Brasil. Apesar do grande número de espécies originárias no Brasil, apenas três são cultivadas comercialmente para a produção de frutos: a *Passiflora edulis* Sim. *F. flavicarpa* Degener (maracujá-amarelo), a *Passiflora edulis* (maracujá-roxo) e a *Passiflora alata* (maracujá-doce), sendo o maracujazeiro-amarelo o mais cultivado no Brasil e no norte de Minas Gerais.

A produção de maracujá-amarelo ganhou grande importância no Brasil, a partir das três últimas décadas (FERREIRA, 2005). Atualmente, é uma cultura muito difundida em todas as regiões do país, tanto pelas condições edafoclimáticas altamente favoráveis, quanto pela aceitação de seu fruto para o consumo *in natura* e para a indústria de polpa de frutas (PIRES *et al.*, 2008), o que coloca o Brasil como o primeiro produtor mundial. Em 2010, a produção atingiu 718.798t em 50.795ha colhidos, sendo a produtividade média nacional de 14,150t.ha⁻¹ (IBGE, 2010). Entre as regiões produtoras, destaca-se o Nordeste (529.102t), Sudeste (110.448t) e o Norte (36.988t). Em relação aos estados produtores, a Bahia se destaca em nível nacional, com produção de 322.755t, em uma área colhida de 23.227ha, acompanhada pelo Ceará, com 129.001t, em 5.579ha; Sergipe, com 44.486t, em 4.709ha; Espírito Santo, com 42.320t em 1.555ha e Minas Gerais, com 35.108t, em 2.425ha (IBGE, 2010). Em Minas Gerais, a maior produção é encontrada na região do Triângulo Mineiro/Alto Paranaíba, com produção de 15.846t em 1.129ha, seguida pela região Norte, com produção de 4.915t, em 338ha. Nessa região, a cidade de Janaúba se destaca, com produção de 1.705t, em 142ha (IBGE, 2010).

Em conformidade com Pires *et al.* (2008), o cultivo do maracujá-amarelo é realizado principalmente por pequenos agricultores, na maioria dos casos com mão de obra familiar e poucos recursos financeiros para investir na cultura. O maracujazeiro-amarelo possui um longo período de safra, variável de 10 a 12 meses no norte de Minas Gerais, permitindo, desse modo, um fluxo de renda mensal equilibrada, aspecto que contribui para elevar o padrão de vida em pequenas propriedades rurais de exploração familiar (LIMA, 1994).

Em termos nutricionais, o maracujá apresenta excelentes qualidades nutritivas, é rico em minerais, em carboidratos e em vitaminas, principalmente

A e C, alcaloides e flavonoides. As fibras de maracujá apresentam potencial no controle da obesidade, diabetes e controle de taxas de colesterol (COSTA; TUPINAMBÁ, 2005).

2.2 Antracnose do maracujazeiro-amarelo (*Colletotrichum gloeosporioides*)

O fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) pertence ao grupo de fungos mitosporicos. A forma teleomórfica, *Glomerella cingulata*, pertence ao filo Ascomycota, classe Ascomycetes (KIRK *et al.*, 2001).

As colônias de *C. gloeosporioides* são variáveis de cinza clara a cinza escura, com micélio aéreo. Os conídios são formados em massas de cor salmão, retos, cilíndricos, de ápice obtuso, base truncada e dimensões de 12–17 x 3,5–6µm. Os conídios são liberados e disseminados quando os acérvulos se encontram úmidos (TAVARES, 2004).

O gênero *Colletotrichum* pertence ao grupo de patógenos que causam a destruição de órgãos de reserva, apresentando-se como uma podridão mole de origem fúngica. A sintomatologia típica das podridões moles efetiva-se, devido à produção de enzimas pectolíticas e toxinas pelo patógeno, as quais promovem desorganização em nível celular, correspondente às lesões de aspecto encharcado, que se desenvolve com rapidez e, além de deprimidas apresentam massa cotonosa, constituída de hifas e de estruturas de frutificação (BEDENDO, 1995).

A disseminação do patógeno ocorre por meio de sementes, de respingos de chuva, de ventos, de insetos, de implementos agrícolas e de mudas infectadas (VIANA, 2003). Os conídios germinam na presença de água e, após a germinação, produzem um apressório, iniciando a penetração no tecido do hospedeiro. Inicialmente, as hifas crescem de forma tanto intercelular como intracelular, porém produzem pouco ou nenhum sintoma nos tecidos (TAVARES, 2004).

A sobrevivência se dá em restos culturais e em tecidos afetados na própria planta. Dessa forma, a doença é mais frequente e severa, a partir do segundo ano de cultivo (PIO-RIBEIRO; MARIANO, 1997).

A antracnose é encontrada em todas as regiões produtoras de maracujá-amarelo do Brasil. Trata-se de uma doença de grande importância, por atacar a parte aérea das plantas em qualquer idade, causando desfolha, seca de ramos e apodrecimento de frutos (PIO-RIBEIRO; MARIANO, 1997). Na pós-colheita, é a principal doença do maracujá, causando grandes prejuízos (RIBEIRO JÚNIOR; DIAS, 2005). É uma doença de difícil controle quando as condições climáticas são favoráveis à epidemia.

Nas folhas, os sintomas se caracterizam por manchas inicialmente pequenas (2-3cm), de aspecto oleoso, com tonalidade de verde mais escura que a folha. Após isso, evoluem, adquirindo coloração parda com bordos pardo-escuros, medindo 1cm de diâmetro. Algum tempo depois, ocorre a coalescência das lesões, formando-se rachaduras e intensa queda de folhas (LIBERATO, 2002; PIO-RIBEIRO; MARIANO, 1997).

Os ramos apresentam manchas com aspecto oleoso de coloração verde mais intensa, alongadas, que se transformam em cancrios, expondo os tecidos do lenho. Quando as lesões circundam os ramos, acarretam a morte das partes acima da área afetada, ocorrendo a queda das folhas e a morte dos ponteiros (PIO-RIBEIRO; MARIANO, 1997).

Nos frutos jovens, as manchas apresentam uma aparência oleosa. Após os frutos atingirem o tamanho máximo, as manchas evoluem e apresentam coloração pardo-clara. Durante o amadurecimento, podem evoluir de duas maneiras: ocorre podridão mole, atingindo toda extensão do fruto ou as manchas tornam-se pardo escuras e deprimidas e profundas, podendo atingir até 3cm de diâmetro, coalescer e cobrir todo o fruto, ocorrendo a formação de tecido corticoso, deprimido e murcho. Em ambos os casos, quase sempre a polpa é atingida, comprometendo o suco (LIBERATO, 2002; PIO-RIBEIRO; MARIANO, 1997).

Em condições de alta umidade, podem surgir, sobre as lesões, frutificações de cor rosa salmão e/ou pontuações escuras, dispostas na forma de anéis concêntricos. A doença é mais severa nos frutos desenvolvidos durante o período chuvoso (JUNQUEIRA *et al.*, 2003).

2.3 Colheita e pós-colheita do maracujá

O maracujá-amarelo é um fruto climatérico, iniciando a produção autocatalítica de etileno e a ascensão climatérica da respiração aos 63 dias após a antese, conduzindo o fruto ao amadurecimento (ENAMORADO, 1985).

Procedimentos inadequados na fase de colheita, como a definição do ponto de colheita pela queda do fruto ao solo após a abscisão, são tradicionalmente utilizados em lavouras pouco tecnificadas. Esse procedimento não é desejável, uma vez que aumenta a pericibilidade do fruto, reduzindo o período de conservação pós-colheita, principalmente em períodos chuvosos (SALOMÃO, 2003), pois o choque e o atrito do fruto com o solo danificam a cutícula e promovem o acúmulo de sujeiras na casa do fruto, favorecendo o estabelecimento de patógenos que vivem no solo, entre eles o *C. gloeosporioides* (GÓES, 1998). Assim, após a colheita, os frutos devem ser lavados, secos, tratados, classificados e embalados (CAMPOS *et al.*, 2005).

O maracujá é considerado um dos frutos tropicais de mais difícil conservação, pois, em pouco tempo, apresenta rápido murchamento, acompanhado pelo desenvolvimento de doenças, que conferem ao fruto má aparência, seguido de fermentação da polpa (DURIGAN, 1998). Após a colheita do maracujá-amarelo, ocorre aumento na suscetibilidade do fruto à colonização por fungos, o que pode determinar perdas quantitativas, principalmente quando ocorre o rápido ataque dos patógenos aos tecidos sadios ou perdas qualitativas, que são decorrentes de efeitos deteriorativos (FISCHER *et al.*, 2007), como descolorações, manchas e produção de odores desagradáveis (CHITARRA; CHITARRA, 1990).

Desde o desenvolvimento dos frutos até a colheita, a resistência natural a doenças declina, resultando nos processos de infecção e doença (SENHOR *et al.*, 2009). Em frutos, as doenças de pós-colheita causadas por fungos, normalmente, são provenientes de infecções quiescentes, estabelecidas no campo ou de infecções por ferimentos, originados durante a colheita e o manuseio. O declínio da resistência natural dos frutos pode ativar

infecções quiescentes e o aumento da incidência e/ou severidade da doença (CIA, 2005). Esse tipo de infecção pode iniciar em qualquer estágio de desenvolvimento da fruta na planta, ocorrendo a inibição do desenvolvimento do patógeno por meio de condições fisiológicas, impostas pelo hospedeiro, até que o estágio de maturação da fruta tenha sido alcançado (JEFFRIES *et al.*, 1990).

As infecções quiescentes ocorrem quando o fungo penetra durante uma das fases de desenvolvimento do fruto na planta-mãe; é arrastado até após a colheita (BARKAI-GOLAN, 2001). A inibição do patógeno ocorre em decorrência de condições fisiológicas, impostas pelo hospedeiro, até que o estágio de maturação do fruto tenha sido alcançado e/ou tenha se iniciado a respiração climatérica (PRUSKY, 1996), favorecendo o desenvolvimento da doença

O mecanismo de quiescência de fungos em frutos pode variar conforme a combinação patógeno-hospedeiro. Os estádios durante os quais o fungo torna-se quiescente podem ocorrer na germinação do esporo, no alongamento do tubo germinativo, na formação de apressórios e na penetração ou subsequente colonização (PRUSKY, 1996).

A ativação da infecção quiescente consiste diretamente da quebra de defesa do hospedeiro e, indiretamente, da detoxificação de agentes antifúngicos presentes no hospedeiro (PRUSKY; LICHTER, 2007).

A resistência de frutas à colonização de fungos foi sumarizada e classificada dentro de quatro hipóteses: a) requerimentos energéticos e nutricionais do patógeno; b) incapacidade do patógeno produzir enzimas capazes de degradar a parede celular do fruto verde; c) presença de compostos antifúngicos pré-formados; d) acumulação de compostos induzidos nos frutos verdes (PRUSKY, 1996).

Dentre as várias doenças identificadas em pós-colheita do maracujá-amarelo, a mais importante é a antracnose. Além do *Colletotrichum gloeosporioides*, outros microrganismos também podem causar podridões em pós-colheita no maracujá, entre os quais, destacam-se: *Alternaria alternata*, *Septoria passiflorae*, *Aspergillus niger*, *Cladosporium* sp., *Penicillium expansum*, *Rhizopus stolonifer* (FISCHER *et al.*, 2007).

2.4 As plantas medicinais e a produção de óleo essencial

O Brasil apresenta grande biodiversidade vegetal, com milhares de espécies catalogadas. Entretanto, pouco se sabe sobre a composição química dessas plantas. Além disso, grande parte dos compostos secundários já isolados de plantas medicinais ainda está para ser estudada, quanto às suas atividades biológicas (STANGARLIN *et al.*, 1999).

Os vegetais são fonte inesgotável de moléculas, muitas ainda desconhecidas, podendo ser utilizadas diretamente ou servir de modelo para síntese química, gerando produtos de baixo custo, eficazes, ambientalmente seguros, padronizados, registrados, com controle de qualidade, visando à reprodutibilidade e à constância de componentes químicos, principalmente, que atendam às necessidades dos produtores (MORAES, 2009).

Os óleos essenciais são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, com baixo peso molecular, geralmente, odoríferas e líquidas, constituídos, na maioria das vezes, por moléculas de natureza terpênica, apresentando odor agradável. Podem ser extraídos por meio de arraste com vapor d'água, hidrodestilação, solventes orgânicos ou expressão de pericarpo de frutos cítricos (MORAES, 2009).

As plantas são importantes fontes de substâncias biologicamente ativas, ou seja, substâncias que apresentam alguma atividade sobre o metabolismo de um organismo vivo. Do ponto de vista fitossanitário, os produtos naturais podem apresentar três atividades principais: antimicrobianos, com atividade direta contra os fitopatógenos, inibindo o crescimento micelial, a produção e a germinação de esporos ou a multiplicação de bactérias e outros fitopatógenos; indutores de resistência, pois contêm moléculas bioativas, capazes de induzir ou ativar os mecanismos de defesa da planta e também os chamados “bioestimulantes” do crescimento da planta (STADNIK *et al.*, 2004).

As plantas sintetizam vários compostos, produtos do metabolismo secundário relacionados à interação da planta com o ambiente. Os princípios ativos sintetizados por vegetais apresentam a função de defesa contra agressões de parasitas. As principais substâncias responsáveis por essa

defesa e capazes de ter uma ação antimicrobiana são: alcaloides, terpenos, fenóis e derivados, flavonoides, ácidos carboxílicos e seus derivados (BOTSARIS, 1995), mas sempre há predominância de umas sobre as outras, tendo normalmente um composto majoritário (CARDOSO *et al.*, 2000).

Os óleos essenciais são substâncias orgânicas voláteis muito conhecidas pelo cheiro que caracteriza certas plantas. Podem estar em um só órgão vegetal, ou em toda a planta. Destacam-se por apresentar uma grande importância terapêutica e econômica. Estão armazenados em estruturas anatômicas, como células oleíferas, cavidades e canais secretores ou em toda a planta, sendo produzidos por pelos ou tricomas glandulares, células de óleo e cavidades secretoras. A composição dos óleos essenciais é determinada por fatores genéticos, porém os fatores ambientais podem causar variações significativas em seus componentes (MARTINS *et al.*, 2002).

A maioria dos óleos essenciais é utilizada na área de alimentos (condimentos e aromatizantes de alimentos e bebidas), cosméticos (perfumes e produtos de higiene) e farmacêuticos (SILVA-SANTOS *et al.*, 2006). Os óleos puros apresentam toxicidade elevada, sendo recomendada a utilização em pequenas dosagens (CARDOSO *et al.*, 2000). Nas plantas, esses óleos desenvolvem funções que estão relacionadas à sua volatilidade, agindo na proteção contra predadores e patógenos, na atração de polinizadores, perda de água e inibidores de germinação de sementes. Nesse contexto, os óleos essenciais recebem atenção especial, pelas diferentes atividades como alternativas ao uso de fungicidas, de herbicidas, de inseticidas e de nematicidas (SODAEIZADEH *et al.*, 2010).

Segundo Kishore e Pande (2007), a inibição do crescimento do fungo promovida por óleo essencial envolve a indução de mudanças na composição da parede celular, a destruição na membrana plasmática e a desorganização na estrutura mitocondrial do fungo, entre outros.

2.4.1 Alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.)

O alecrim-pimenta pertence à família Verbenaceae. Também é conhecido como: alecrim-do-nordeste e estrepacavalo. É uma planta medicinal nativa da região do semiárido nordestino e do norte de Minas Gerais. É um arbusto silvestre, com até 3m de altura; folhas simples, compostas, com margens crenadas, pelos esbranquiçados na face inferior, aromática e de sabor picante; flores de cor branca, em racimos, cálice curto e membranáceo; caule quebradiço (MARTINS *et al.*, 2002).

Possui grande valor terapêutico, sendo empregado no combate a micro-organismos, como analgésico, sedativo e expectorante. As folhas do alecrim-pimenta apresentam 4% de óleo essencial, que vem sendo comercializado junto às indústrias de cosméticos, o que lhe confere uma grande importância econômica (COSTA, 2006; MARTINS *et al.*, 2002). O óleo essencial tem cerca de 60% de timol ou uma mistura de timol e carvacrol; além disso, dentre os componentes químicos fixos, estão flavonoides e quinonas (LORENZI; MATOS, 2002).

2.4.2 Capim-santo (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf.)

O capim-santo, também conhecido como capim-cidrô, capim-limão, capim-cidreira, capim-cidrão, chá de-estrada, erva-cidreira, citronela-de-java, lemon grass, west indian lemongrass. É uma erva perene, cespitosa, formando touceiras compactas e robustas de até 1,2m de altura, com rizoma semi-subterrâneo, pertencente à família Poaceae (CASTRO; RAMOS, 2003).

É originária da Ásia e subespontânea nos países tropicais. As suas folhas são aromáticas, pontudas, ásperas e estreitas. A planta é usada como antiespasmódico, calmante, analgésico e contra dores estomacais (MARTINS *et al.*, 2002). O seu óleo essencial contém citral (47% a 85%), geraniol, mirceno, dentre outros (MARTINS *et al.*, 2002), sendo usado em perfumaria para a produção de β -ionona (aroma de violetas), na síntese da vitamina A, como bactericida, além de possuir ação fungistática (RAUBER *et al.*, 1999). Por essas aplicações, o óleo essencial do capim-santo possui procura no

mercado nacional e internacional, com preços considerados compensadores (RAUBER *et al.*, 1999).

2.4.3 Alfavaca-cravo (*Ocimum gratissimum* L.)

A alfavaca-cravo, alfavaca ou alfavacão é um subarbusto aromático, com até 1m de altura, originário da Ásia e África, pertencente à família Lamiaceae (MARTINS *et al.*, 2008). Segundo Lorenzi e Matos (2002), é de ocorrência comum em todo o território Brasileiro.

Possui folhas ovalado-lanceoladas, de bordos duplamente dentados, membranáceas, de 4-8cm de comprimento. Flores pequenas, roxo-pálidas, dispostas em racemos paniculados eretos, e geralmente, em grupos de três. Fruto do tipo cápsula, pequeno, possuindo quatro sementes esféricas. Tem aroma forte e agradável que lembra o cravo-da-índia. As folhas de alfavaca-cravo contêm 3,6% de óleo essencial, sendo que 73,3% são eugenol, 12,1% de 1,8 cineol, 2,3% de *b*-cariofileno, 2,1% de *Z*-ocimeno. O Seu óleo essencial possui ação bactericida e analgésica de uso em odontologia, devido ao eugenol (LORENZI; MATOS, 2002).

2.5 Controle alternativo de doenças

Segundo Wheeler (2002), o uso de agroquímicos na agricultura teve início na década de 1950, com a finalidade de aumentar a produção agrícola. Entretanto alguns desses agrotóxicos empregados no início dessa fase, especialmente do grupo dos organoclorados e fosforados, trouxeram efeitos indesejáveis ao homem e ao ambiente. Como consequência, aumentaram-se as pressões da sociedade no sentido de se reduzirem os riscos aos envolvidos na aplicação de agrotóxicos de forma geral.

Os órgãos governamentais em todo o mundo aumentaram as restrições para o registro e o uso de agrotóxicos na agricultura. As indústrias químicas foram estimuladas a desenvolver produtos menos tóxicos aos seres humanos e ao meio ambiente (WHEELER, 2002). Paralelamente, cresceram os movimentos de grupos organizados da sociedade em favor da redução do

uso desses agrotóxicos na agricultura e também se expandiu o mercado de produtos orgânicos (PATRÍCIO, 2007). Essas pressões forçaram a substituição de agroquímicos inorgânicos por orgânicos sintéticos e, mais recentemente, o aparecimento de biopesticidas (WHEELER, 2002).

A área cultivada com maracujazeiro-azedo no Brasil vem aumentando ao longo dos anos, entretanto essa expansão não tem sido acompanhada de cuidados necessários para se evitar a disseminação de doenças. Esse comportamento propicia o aumento de problemas fitossanitários, a ponto de reduzir o tempo de exploração econômica da cultura, podendo, em alguns casos, inviabilizar o cultivo em determinadas regiões (SANTOS FILHO; JUNQUEIRA, 2003).

A utilização de fungicidas é a medida de manejo da antracnose do maracujá-amarelo mais comumente utilizada. A vantagem desse método de controle é o efeito residual, que garante a proteção na planta, e durante o armazenamento prolongado dos frutos. Entretanto o uso desses agrotóxicos é realizado muitas vezes, indiscriminadamente, o que onera grandemente o custo de produção, além de tornar inviável a adoção dessa prática pelos agricultores orgânicos e familiares. Para Ghini e Kimati (2000), o uso excessivo de agrotóxicos leva também ao surgimento de fitopatógenos resistentes aos agrotóxicos. Esse uso implica na contaminação do solo e da água, na desertificação e em muitos outros fatores que alteram o equilíbrio ambiental, trazendo, ao longo dos anos, graves problemas para a saúde do homem e dos animais (BETTIOL, 2001; CAMPANHOLA; BETTIOL, 2003; RODRIGUES, 2003).

Além disso, atualmente no Brasil, não há nenhum fungicida registrado para a aplicação em maracujá na pós-colheita. Em culturas que dispõem de produtos registrados para tratamento na pós-colheita, ocorrem problemas relacionados à fitotoxidez, à permanência de resíduos, ao espectro de ação ao desenvolvimento de organismos resistentes. Dessa forma, tem-se restringido o uso de fungicidas em pós-colheita nos últimos anos e esse fato tem levado à procura de métodos alternativos de controle de doenças (BENATO *et al.*, 2002).

Importante preocupação se deve ter também em relação aos produtores orgânicos, os quais não possuem muitas alternativas para o controle da antracnose, uma vez que a maioria dos produtos disponíveis para o controle da doença não pode ser utilizado, pois o sistema de produção orgânica praticamente proíbe o uso de agrotóxicos. Além disso, muitos agricultores familiares da região norte de Minas Gerais comercializam os seus produtos junto a uma cooperativa agroextrativista, que trabalha com produtos livres de agroquímicos, incentivando a produção orgânica e a produção agroecológica das diversas culturas. Aliado a esses fatos, deve-se destacar também o crescimento da exigência dos consumidores por alimentos livres de agrotóxicos e as várias pesquisas que estão sendo realizadas, voltadas para a busca de produtos fitossanitários naturais.

A utilização de produtos naturais no controle de fitodoenças pode se tornar um meio eficiente para a redução do uso sem critérios de defensivos. A exploração da atividade biológica dos compostos secundários de plantas tem surgido como uma forma potencial de controle alternativo de doenças nas plantas cultivadas. Alguns extratos vegetais e óleos essenciais já foram testados sobre fungos fitopatogênicos em diversos trabalhos (BASTOS; ALBUQUERQUE, 2004; CARNELOSSI *et al.*, 2009; GADELHA *et al.* 2003; MEDICE *et al.* 2007; MOLINA *et al.*, 2010; SALGADO *et al.* 2003; SALUSTIANO *et al.* 2006; SILVA *et al.* 2009, SOUZA JÚNIOR, *et al.*, 2009).

De acordo com Diniz *et al.* (2006), sistemas de produção alternativos podem ser importantes na redução dos impactos ambientais e sociais, causados pelo atual modelo de produção agrícola. Com a implementação desses sistemas, reduzem-se os riscos de contaminação do meio ambiente e de intoxicação de operadores e de consumidores.

Para Bettioli (2001), uma das maiores dificuldades para ampliar o uso de métodos alternativos é que, normalmente, esses produtos não são disponíveis no mercado, exigindo que o produtor prepare o seu próprio material a ser pulverizado. Essa, apesar de ser uma dificuldade, é uma vantagem para o agricultor, pois diminui a necessidade de insumos externos.

Medidas culturais, como a realização de podas de limpeza e a remoção de restos culturais (folhas e frutos), o uso de mudas saudáveis, manejo

da irrigação e a adubação equilibrada, também podem ser realizadas, visando ao controle da antracnose. Na fase de colheita e pós-colheita, o manuseio adequado dos frutos, evitando-se ferimentos, pode reduzir a incidência do patógeno. Quanto mais sadios os frutos chegarem ao galpão de embalagem, maior será o sucesso na redução das perdas causadas por doenças (GARCIA *et al.*, 2002) e maior será o tempo de prateleira desses frutos.

2.6 Óleos essenciais no controle de fungos *in vitro*

Trabalhos desenvolvidos com óleos essenciais, obtidos a partir de plantas medicinais da flora nativa e exótica, têm indicado o potencial das mesmas no controle de fitopatógenos, por sua ação fungistática e/ou fungitóxica, inibindo o crescimento micelial, a produção e a germinação de esporos.

Bastos e Albuquerque (2004) realizaram testes *in vitro*, com óleo essencial de pimenta-de-macaco (*Piper aduncum* L.) sobre o patógeno *Colletotrichum musae*, causador da antracnose, doença mais importante da banana (*Musa* spp.). Esses autores observaram que houve 100% de inibição na germinação e no crescimento, nas concentrações de 100 e 150 µg.mL⁻¹, respectivamente. Quanto ao efeito do óleo no controle da podridão de frutos, verificou-se que todos os tratamentos (0,05, 0,1, 0,3, 0,5 e 1,0%) reduziram a incidência e a severidade da doença, sendo que o melhor desempenho para o controle da doença foi obtido com o óleo a 1,0%.

Salgado *et al.* (2003) avaliaram a atividade fungitóxica de óleos essenciais de eucaliptos sobre os fitopatógenos *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* e *Bipolaris sorokiniana*. Os autores verificaram que os óleos essenciais de *Eucalyptus urophylla*, *Eucalyptus citriodora* e *Eucalyptus camaldulensis* apresentaram diferentes potenciais fungitóxicos sobre esses fungos. As diferentes concentrações dos óleos inibiram o crescimento micelial de todos os patógenos estudados. No entanto, o óleo com maior ação fungitóxica foi de *E. urophylla*, sendo essa atividade atribuída à

presença do composto denominado globulol, ausente no *E. camaldulensis* e no *E. citriodora*.

Gadelha *et al.* (2003) estudaram a ação de dois fungicidas naturais à base de óleos essenciais das espécies *Lippia sidoides*, *Mentha arvensis*, *Ocimum gratissimum*, *Eucalyptus terenticornis* e o óleo comercial de soja, para o tratamento pós-colheita do pedúnculo do melão *Orange Flesh*. No fungicida 1, combinaram-se *L. sidoides*, *M. arvensis*, *O. gratissimum* e *G. max* e, no fungicida 2, *L. sidoides*, *O. gratissimum*, *E. terenticornis* e *G. max*. O fungicida 1 foi mais eficiente que o fungicida 2. O tratamento preventivo foi melhor que o curativo.

Medice *et al.* (2007) constataram que os óleos essenciais de *Corymbia citriodora*, *Cymbopogon nardus*, *Azadirachta indica* e *Thymus vulgaris* L., nas concentrações 1%, 0,5%, 1% e 0,3%, respectivamente para cada óleo, inibiram 100% a germinação dos uredinósporos de *Phakopsora pachyrhizi*, em meio ágar-água. Em casa de vegetação, observou-se que todos os óleos retardaram a evolução da doença ferrugem asiática, quando comparados com a testemunha (água destilada esterilizada).

Salustiano *et al.* (2006) avaliaram a atividade de extratos de folhas e do óleo essencial da candeia [*Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish] sobre a germinação de uredinósporos ferrugens, *Puccinia psidii*, *Hemileia vastatrix*, *Phakopsora pachyrhizi*, e *Cerotelium fici* e sobre o crescimento micelial de *Cilindrocladium scoparium*. Os uredinósporos de todas as ferrugens não germinaram, quando submetidos ao tratamento. A inibição do crescimento micelial de *C. scoparium* (52%) foi maior no extrato metanólico, com consequente redução da produção de esporos. Ambos os tratamentos, chá a 10% e óleo essencial a 1%, reduziram em 25% o crescimento micelial do fungo e em 28% e 34%, respectivamente, a produção de esporos.

Silva (2009), testando óleos essenciais de *Hyptis marrubioides*, *Aloysia gratissima* e *Cordia verbenacea*, em concentrações de 0,05, 0,1 e 0,3%, no tratamento preventivo da ferrugem asiática da soja, observou que todos os óleos testados, mesmo na concentração mais baixa, reduziram o progresso da severidade da ferrugem acima de 49%. Já na concentração de 0,3%, a redução foi de 64,5, 71,2 e 67,1%, no progresso da severidade em relação à

testemunha (água destilada esterilizada), para o óleo de *C. verbenacea*, *A. gratissima* e *H. marrubioides*, respectivamente.

Em estudo realizado por Silva *et al.* (2009) avaliando o extrato bruto, óleo essencial e hidrolato de 13 plantas medicinais e/ou nativas, utilizadas pelos agricultores do norte de Minas Gerais, observaram que todos os óleos essenciais testados inibiram a germinação e o crescimento micelial do *C. gloeosporioides* do maracujazeiro-amarelo, porém os extratos brutos e hidrolatos não tiveram efeito direto sobre o patógeno *in vitro*.

Não há um consenso sobre o nível de inibição aceitável para produtos naturais, quando comparados com fungicida padrão, tanto que alguns autores consideram somente resultados similares aos fungicidas, enquanto outros consideram com bom potencial de controle aqueles produtos com níveis de inibições inferiores aos fungicidas (DUARTE, 2006).

2.7 Óleos essenciais no tratamento pós-colheita de frutos

Pesquisas realizadas com óleos essenciais de plantas medicinais no tratamento de frutos na pós-colheita evidenciam o potencial dos mesmos no controle de fitopatógenos, por sua ação fungistática e/ou fungitóxica.

Bastos e Albuquerque (2004), trabalhando com o efeito do óleo de *Piper aduncum* (0,05, 0,1, 0,3, 0,5 e 1,0%), no controle em pós-colheita de *Colletotrichum musae*, em banana, verificaram que todas as concentrações reduziram a incidência e a severidade da doença, em comparação com a testemunha, sendo que, na maior concentração, o efeito foi igual ao fungicida e o fungo não causou doença nos frutos.

Carnelossi *et al.* (2009), testando óleos essenciais no controle pós-colheita de *C. gloeosporioides* em mamão, observaram área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para os frutos tratados e inoculados imediatamente. A menor AACPD foi verificada no tratamento com *C. citratus* e *Eucalyptus citriodora*, demonstrando que a doença foi menos severa, quando os frutos foram tratados com esses óleos. Já para o progresso da doença dos frutos tratados e inoculados após 24h, a menor AACPD foi observada no tratamento com *C. citratus*.

Molina *et al.* (2010), avaliando o efeito inibitório de óleos essenciais de *Citrus aurantifolia* (0,14%) e *Thymus vulgaris* (0,15%), no controle de *C. gloeosporioides* e *Rhizopus stolonifer*, em mamão, observaram redução de 50 e 40 % na incidência dos dois patógenos, respectivamente.

Gadelha *et al.* (2003), avaliando defensivos naturais no tratamento pós-colheita de pedúnculo de melão, observaram melhores resultados com uma mistura de óleos essenciais, o óleo de *L. sidoides* e *O. gratissimum*, na prevenção da proliferação de fungos e, à medida que se aumentava a concentração dos óleos, ocorreu redução nessa proliferação.

Gomes (2008), avaliando o efeito dos óleos essenciais de *Syzygium aromaticum*, *Cymbopogon citratus* e *Thymus vulgaris* sobre a antracnose em mamão, conseguiu redução no diâmetro das lesões da doença para todos os óleos estudados, principalmente na maior concentração testada. Garcia *et al.* (2008) trataram mamão, pela imersão em solução à base de citral a 1%, obtido do *C. citratus* e observaram redução de 70% do diâmetro das lesões de antracnose, quando comparado com a testemunha.

Os óleos essenciais de *Eucalyptus citriodora* e de *Cuminum cyminum* suprimiram o desenvolvimento de lesões em 59 e 37% nas concentrações de 8 e 10 μ L.L⁻¹, respectivamente, causadas por *Botrytis cinerea* em maçã (LEE *et al.*, 2007).

3 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral dessa pesquisa foi investigar a ação de óleos essenciais de *Lippia sidoides*, de *Cymbopogon citratus* e de *Ocimum gratissimum* sobre o *Colletotrichum gloeosporioides* do maracujazeiro-amarelo.

CAPÍTULO 2 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA E EFEITO ANTIFÚNGICO DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE TRÊS PLANTAS MEDICINAIS

RESUMO

Esta pesquisa teve por objetivo investigar a composição química dos óleos essenciais de *Lippia sidoides*, *Cymbopogon citratus* e *Ocimum gratissimum* e avaliar a ação fungistática e fungitóxica desses óleos essenciais sobre o fungo *C. gloeosporioides*. Os óleos foram analisados por cromatografia, em fase gasosa, acoplada com espectrometria de massas. A atividade antifúngica foi avaliada no delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5x3, sendo cinco concentrações (0, 1, 3, 5 e 7 $\mu\text{L mL}^{-1}$) x óleos essenciais de três espécies medicinais, com quatro repetições. O timol (30,24%), os isômeros *E*- e *Z*-citral (77,74%) e o eugenol (92,89%) foram encontrados como componentes majoritários nos óleos essenciais de *L. sidoides*, *C. citratus* e *O. gratissimum*, respectivamente. Verificou-se a interação significativa da concentração *versus* espécies sobre todas as características avaliadas. O óleo essencial de *C. citratus* proporcionou a maior inibição do crescimento micelial em todas as concentrações testadas. Os outros óleos não se diferenciaram, exceto a partir da concentração de 5 $\mu\text{L mL}^{-1}$, na qual o óleo de *L. sidoides* foi mais eficiente que o óleo de *O. gratissimum*. Na produção e na germinação de conídios, o óleo de *C. citratus* foi superior aos óleos de *L. sidoides* e de *O. gratissimum*, nas concentrações de 1 e 3 $\mu\text{L mL}^{-1}$, inibindo, completamente, a produção e a germinação, a partir da concentração de 3 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Observa-se decréscimo nessas, à medida que as concentrações dos óleos foram aumentadas. Os óleos essenciais utilizados possuem efeito fungitóxico e fungistático, sugerindo que o timol, o citral e o eugenol são os responsáveis pela atividade observada.

Palavras-chave: *Colletotrichum gloeosporioides*. *Passiflora edulis*. Antracnose. Compostos vegetais.

CHAPTER 2 - CHEMICAL COMPOSITION AND ANTIFUNGAL EFFECT OF ESSENTIAL OILS OF THREE MEDICINAL PLANTS

ABSTRACT

The objective of this research was to investigate the chemical composition of essential oils from *Lippia sidoides*, *Cymbopogon citratus* and *Ocimum gratissimum* and evaluate the fungitoxic and fungistatic action of these essential oils on the fungus *C. gloeosporioides*. The oils were analyzed by chromatography, in gas phase, coupled with mass spectrometry. The antifungal activity was evaluated in a completely randomized design in factorial scheme 5x3, being five concentrations (0, 1, 3, 5 and 7 $\mu\text{L mL}^{-1}$) x essential oils of three medicinal species, with four replications. The thymol (30.24%), the isomers E- and Z-citral (77.74%) and eugenol (92.89%) were found as major components in the essential oils of *L. sidoides*, *C. citratus* and *O. gratissimum*, respectively. It was verified the significant interaction of concentration versus species on all evaluated characteristics. The essential oil of *C. citratus* proportioned the highest inhibition of growth mycelial at all concentrations tested. The other oils did not differ, except, from the concentration of 5 $\mu\text{L mL}^{-1}$, in which the oil of *L. sidoides* was more effective than the oil of *O. gratissimum*. In production and germination of conidial, the oil of *C. citratus* was superior to the oils of *L. sidoides* and *O. gratissimum*, at concentrations of 1 and 3 $\mu\text{L mL}^{-1}$, inhibiting completely the production and germination, from the concentration of 3 $\mu\text{L mL}^{-1}$. It was observed a decrease in these, in the measure that the concentrations of oil were increased. The essential oils used have fungitoxic and fungistatic effect, suggesting that thymol, citral and eugenol are the responsible for the observed activity.

Keywords: *Colletotrichum gloeosporioides*. *Passiflora edulis*. Anthracnose. Vegetable compounds.

1 INTRODUÇÃO

A cultura do maracujazeiro-amarelo vem se expandindo no Brasil, deixando de ser a décima quinta frutífera mais produzida no país em 2006 (NASCIMENTO, 2006), para ocupar a oitava posição, com área plantada de aproximadamente 50.795ha (IBGE, 2010), o que coloca o país como maior produtor dessa fruta no mundo. A cultura desempenha importante função social nas regiões onde é explorada, garantindo emprego e agregação de renda aos agricultores familiares do norte de Minas Gerais.

Um dos principais entraves ao desenvolvimento dessa cultura é a ocorrência de doenças; entre elas, a antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides*. Essa doença ocorre em todas as regiões de cultivo do maracujá-amarelo no Brasil, sendo uma das doenças mais importantes da cultura (LIMA, 2002). Em época quente e chuvosa, característica do verão nessa região e, na ausência de controle efetivo, causa intensa desfolha, seca de ramos e apodrecimento de frutos. Isso provoca a redução da produtividade das plantas e a baixa qualidade dos frutos, causando grandes prejuízos aos produtores (LIBERATO, 2002).

O controle químico realizado muitas vezes de maneira não recomendada ao longo dos anos, traz graves problemas à saúde do homem, dos animais e para o meio ambiente, como a contaminação da água e do solo. Outra consequência negativa do uso de agrotóxicos é a seleção de raças do patógeno, resistentes a doses cada vez mais crescentes (GHINI; KIMATI, 2000).

Para minimizar esse impacto, o uso do fungicida nas doses recomendadas, a rotação do princípio ativo e do modo de ação, bem como a busca de produtos alternativos no controle de fitopatógenos, como, por exemplo, o uso de compostos do metabolismo secundário de plantas, têm sido constantemente pesquisados. Nesse contexto, as espécies medicinais recebem atenção especial, pelas diferentes atividades, como alternativa ao uso de fungicidas, de herbicidas, de inseticidas e de nematicidas (SODAEIZADEH *et al.*, 2010), porém o uso de óleos essenciais e a sua ação necessitam de mais pesquisas (NASCIMENTO *et al.*, 2007). Na literatura,

são encontrados alguns trabalhos sobre o efeito de óleos essenciais de várias plantas, no controle de fungos fitopatogênicos (ANARUMA *et al.*, 2010; FRIAS; KOZUSNY-ANDREANI, 2009; MEDICE *et al.*, 2007; NASCIMENTO *et al.*, 2008; ÖZEK *et al.*, 2010; ROZWALKA *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2009; SOUZA JÚNIOR *et al.*, 2009; ZACARONI *et al.*, 2009). Entretanto há uma grande parcela de plantas brasileiras que ainda não foram pesquisadas e entre as estudadas, pouco se conhece sobre a composição dos seus óleos essenciais e a ação de seus compostos químicos sobre os fitopatógenos.

Objetivou-se nesta pesquisa, investigar a composição química dos óleos essenciais de *Lippia sidoides*, *Cymbopogon citratus* e *Ocimum gratissimum* e avaliar a ação fungistática e fungitóxica desses óleos essenciais sobre o *C. gloeosporioides* do maracujazeiro-amarelo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Esta pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Fitopatologia do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais, em Montes Claros-MG. O patógeno foi isolado no Laboratório de Fitotecnia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, a partir de lesões características da antracnose em folhas de maracujazeiro-amarelo, procedentes do pomar experimental da UFRRJ. Adotou-se a metodologia descrita por Alfenas e Mafia (2007). Foi obtida a cultura monospórica, conforme Silva *et al.* (2009).

2.1 Análise cromatográfica dos óleos essenciais obtida das plantas (*Lippia sidoides*, *Cymbopogon citratus* e *Ocimum gratissimum*)

As análises cromatográficas dos óleos essenciais foram realizadas no Laboratório de Análise e Síntese de Agroquímicos da Universidade Federal de Viçosa. A análise consistiu na identificação e na quantificação dos componentes do óleo essencial por cromatografia gasosa, acoplada com espectrometria de massas (CG-EM), de acordo com a metodologia descrita por Adams (1995).

Os óleos essenciais foram extraídos por arraste por vapor de água, utilizando-se o destilador piloto (Linax®, modelo D20). As plantas foram escolhidas a partir da seleção em dois outros estudos (SILVA *et al.*, 2009; SOUZA JÚNIOR *et al.*, 2009). Para isso, coletaram-se 5kg de folhas de cada espécie medicinal: alecrim-pimenta (*Lippia sidoides*), capim santo (*Cymbopogon citratus*) e alfavaca cravo (*Ocimum gratissimum*), no período da manhã (07h30min). No Laboratório de Plantas Medicinais do ICA, as plantas foram acondicionadas no destilador, para a extração do óleo essencial, durante 3 horas. Após esse processo, o óleo foi separado do hidrolato, por partição líquido-líquido e retirado com micropipeta, sendo o óleo armazenado em frasco âmbar, envolto com papel alumínio, mantendo-o sobre refrigeração (5°C).

Amostras (2,0mg) dos óleos foram pesadas em um vial para derivatização (próprio para este processo) e, em seguida, dissolvidas em 60µL de piridina e 100µL de BSTFA ((N,O-bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamida) contendo 44,1% de clorotrimetilsilano. A mistura reacional foi aquecida a 70°C, por 30min em banho-maria. Da solução obtida, apenas 1µL foi injetado no CG-EM, sendo o procedimento realizado em triplicata.

As análises foram realizadas no aparelho CG-EM PQ5050A, da marca Shimadzu, utilizando-se coluna capilar de sílica fundida DB-5 (5% de difenil e 95% dimetilsiloxano), com 30m de comprimento, 0,25mm de diâmetro interno, filme de 0,25µm e hélio como gás de arraste. As condições cromatográficas foram as seguintes: a temperatura do injetor foi de 290°C, iniciando com 80°C, por 5 minutos, aumentando de 80°C a 290°C, na razão

de 4°C/min. A temperatura final permaneceu em 290°C, por 40 minutos. A temperatura do detector e da interface do sistema CG-EM foi de 290°C. O detector de massas operou com ionização, por impacto de elétrons de 70 eV e varredura de massas de 30 a 600 m/z (SILVÉRIO *et al.*, 2008).

A identificação dos componentes dos óleos foi realizada por comparação dos espectros de massas do banco de dados do aparelho (Wiley 330.000) com dados da literatura e também com injeção de amostras de substâncias padrão. Também foi utilizado o índice de Kovats, para a confirmação da identificação dos compostos. A quantificação dos componentes do óleo essencial foi realizada em cromatógrafo a gás, com detector, por ionização em chamas (CG-FID).

A atividade antifúngica foi avaliada pelo efeito fungistático dos óleos essenciais pela ação no crescimento micelial e o efeito fungitóxico, pela ação na produção e na germinação dos conídios do *C. gloeosporioides*.

2.2 Avaliação do crescimento micelial e produção de conídios de *Colletotrichum gloeosporioides*, em diferentes concentrações os óleos essenciais

Para a obtenção das soluções dos óleos essenciais, preparou-se, inicialmente, uma solução estoque, contendo 99mL de água destilada esterilizada e 1mL de Tween 80® (monoleato de sorbitano polioxietileno) a 1% (v/v). No preparo da concentração de 1µL.mL⁻¹, acrescentaram-se 10µL do óleo essencial em 10mL da solução estoque. As demais concentrações foram obtidas, proporcionalmente para 3, 5 e 7 µL.mL⁻¹. Acrescentou-se, 1mL de cada concentração em 19mL de meio BDA fundente, resfriado até 45°C. Em câmara de fluxo laminar, transferiu-se um disco de 5mm de diâmetro da cultura monospórica com oito dias, para o centro de cada placa, contendo as concentrações dos óleos essenciais das diferentes plantas medicinais. As laterais das placas foram vedadas com filme plástico transparente, para evitar possíveis evaporações dos compostos e ressecamento do meio de cultura. Todo procedimento foi realizado em condições assépticas na capela de fluxo laminar.

Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5x3, sendo cinco concentrações (0, 1, 3, 5 e 7 $\mu\text{L.mL}^{-1}$) e três óleos essenciais das espécies *L. sidoides*, *C. citratus* e *O. gratissimum*, com quatro repetições. Cada repetição constituiu-se de uma placa de Petri, de 9cm de diâmetro, com meio BDA. Adotou-se como testemunha a concentração 0 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ (BDA mais solução estoque).

As placas foram incubadas em câmara tipo BOD, à temperatura de 25°C sob fotoperíodo de 12 horas. A avaliação do efeito das concentrações foi realizada por meio de medições diárias do diâmetro das colônias em dois eixos ortogonais (média das duas medidas diametricamente opostas), a qual iniciou-se 48 horas após a inoculação do fungo e finalizou-se no décimo dia. Após esse período, determinou-se o Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM), utilizando a equação adaptada por Oliveira (1991):

$$\text{IVCM} = \sum (D - D_a) / N,$$

Onde: IVCM= Índice de velocidade de crescimento micelial,

D = Diâmetro médio atual,

D_a = Diâmetro médio do dia anterior e;

N = Número de dias após a montagem do experimento (repicagem do fungo).

Após a avaliação do crescimento micelial, adicionaram-se às placas com o fungo 10mL de água destilada esterilizada. A seguir, utilizando-se alça de Drigalski, procedeu-se à raspagem das colônias, para a liberação dos conídios. Após a filtragem da suspensão em duas camadas de gaze esterilizada, realizou-se a contagem do número de conídios em câmara de Neubauer.

2.3 Avaliação dos óleos essenciais de diferentes plantas medicinais na germinação de conídios de *Colletotrichum gloeosporioides*

A suspensão de conídios do *C. gloeosporioides* foi colocada sobre o meio ágar-água, contendo os diferentes óleos essenciais das plantas

medicinais, para estudar o efeito desses óleos sobre a germinação dos conídios. Para isso, a partir de uma suspensão de conídios de *C. gloeosporioides*, na concentração de 2×10^7 conídios.mL⁻¹, obtida de colônia pura cultivada por 8 dias em meio BDA, obtiveram-se alíquotas de 30µL, que foram adicionadas sobre um bloco de meio ágar-água a 10% com 2cm² de área superficial, mantida sobre um lâmina de vidro para microscopia esterilizada. Em seguida, adicionaram-se, sobre cada bloco, alíquotas de 30µL de cada concentração do óleo das diferentes plantas estudadas, cobrindo-se, com uma lamínula, o bloco de ágar-água. Após a montagem, as lâminas foram mantidas em placas de vidro, de 14cm de diâmetro, contendo duas folhas de papel de filtro umedecidas, com água destilada estéril. O conjunto foi armazenado em câmaras de incubação tipo BOD a 25°C, com fotoperíodo de 12 horas. O estudo foi conduzido com o delineamento experimental e tratamentos, como descrito no item 2.2.

Após 18 horas de incubação, adicionaram-se duas gotas de lactofenol e azul de tripan, para inibir a germinação dos conídios após esse período e facilitar a visualização ao microscópio óptico. A germinação dos conídios foi determinada em dois campos de visão, escolhidos ao acaso, analisando 100 conídios por campo. Considerou-se conídio germinado aquele que apresentou o comprimento do tubo germinativo maior ou igual ao diâmetro do conídio (SILVA, 2009; TAVARES; SOUZA, 2005). A partir do número total de conídios contados germinados e não germinados, estimou-se o percentual de esporos germinados.

Os dados de ambos os ensaios foram submetidos à análise de variância. As médias dos dados qualitativos foram comparadas pelo teste Tukey ($p \leq 0,01$) e os dados quantitativos, submetidos à regressão polinomial ($p \leq 0,01$), conforme Banzatto e Kronka (2006).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análise cromatográfica dos óleos essenciais obtida das plantas (*Lippia sidoides*, *Cymbopogon citratus* e *Ocimum gratissimum*)

Foram detectados 24 compostos no óleo essencial do *L. sidoides* (FIG. 1). Destacam-se o timol (30,24%), o benzeno (14,49%), o *trans*-beta-cariofileno (11,82%), o borneol (11,38%), o metil timil éter (8,32%) e o *gamma*-terpineno (8,05%). Os principais constituintes do óleo de *C. citratus* foram: os isômeros *E*-citral (43,69%) e *Z*-citral (34,05%), o *beta*-mirceno (15,11%), o *trans*-beta-cariofileno (4,19%), entre outros. Para o óleo essencial de *O. gratissimum*, o eugenol foi o constituinte químico com predomínio (92,89%), seguido pelo *beta*-bisaboleno (5,92%) (TAB. 1).

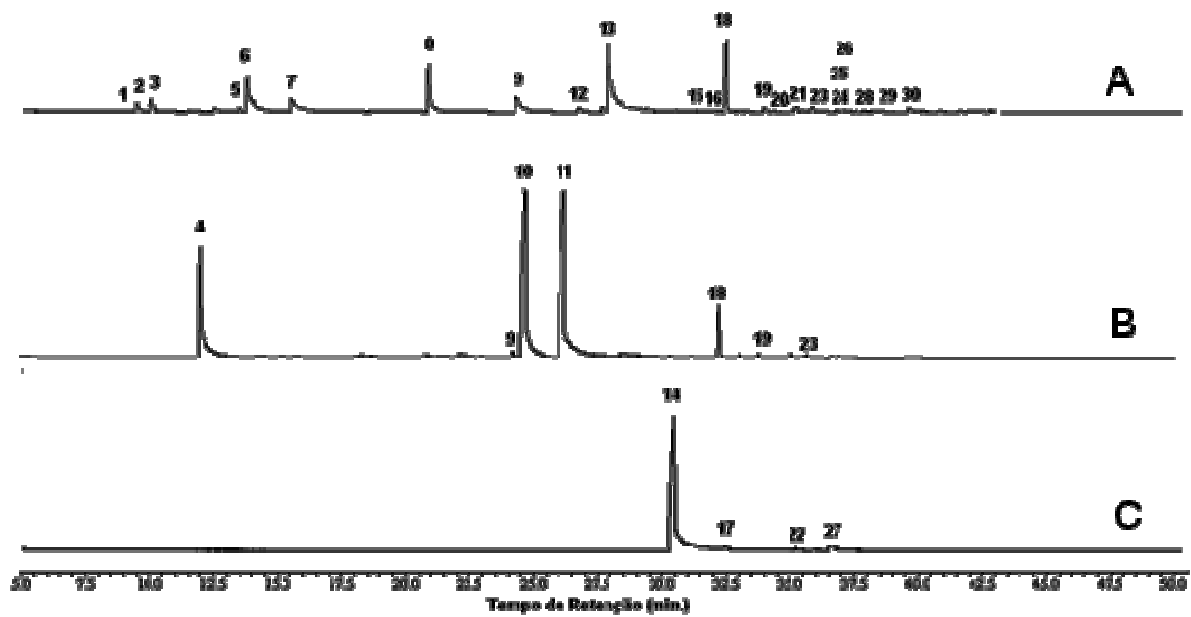


FIGURA 1 - Perfis cromatográficos dos óleos essenciais:

(A) *Lippia Sidoides*

(B) *Cymbopogon citratus*

(C) *Ocimum gratissimum*.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Craveiro *et al.* (1981) também relatam o timol (60%) como principal constituinte do óleo de *L. sidoides*, valor bem acima do encontrado na presente pesquisa, indicando que há quimiótipos na espécie. Já para o *Trans*-beta-cariofileno (10%), os valores são próximos aos observados nesta pesquisa. Craveiro *et al.* (1981), trabalhando com o óleo essencial de *C. citratus*, identificaram alto teor de citral (80%) e mirceno (16%), o que também foi observado nesta pesquisa. Entretanto Pereira *et al.* (2008), em estudo com a mesma espécie, observaram o neral (40,2%), geranial (31,8%), que, isomericamente, formam o citral, o mirceno (19,7%), o neo-mentol (1,1), o acetato de linalila (0,4%), o *Z*-ocimeno (1,1%) e o *E*-ocimeno (1,4%). Franco *et al.* (2007), avaliando a composição química do óleo de *O. gratissimum*, observaram também o predomínio de eugenol, entretanto com percentual bastante inferior (57,82%) ao observado nesta pesquisa. Algumas variações justificam-se em razão da época de plantio, do tipo de solo, do clima, dos aspectos genéticos da planta, além do método de extração do óleo.

TABELA 1

Quantificação e identificação dos componentes químicos presentes nos óleos essenciais de *Lippia sidoides*, de *Cymbopogon citratus* e de *Ocimum gratissimum* (continua)

Pico	RT*	Composto químico	<i>Lippia sidoides</i> (%)	<i>Cymbopogon citratus</i> (%)	<i>Ocimum gratissimum</i> (%)
1	9,35	Felandreno	0,07	—	—
2	9,48	Alfa-pineno	1,92	—	—
3	10,08	Canfeno	3,76	—	—
4	12,50	Beta-mirceno	0,94	15,11	—
5	13,46	Alfa-terpineno	1,16	—	—
6	13,83	Benzeno	14,49	—	—
7	15,56	Gama-terpineno	8,05	—	—
8	20,93	Borneol	11,38	0,42	—
9	24,33	Metil timid éter	8,32	—	—
10	24,93	Z-citral	—	34,05	—
11	26,43	E-citral	—	43,69	—
12	26,75	Acetato de bornila	1,14	—	—
13	27,95	Timol	30,24	—	—
14	30,47	Eugenol	—	—	92,89
15	30,56	Alfa-cubebeno	0,29	—	—
16	31,37	Beta-elemeno	0,16	—	—
17	32,46	Trans-Cariofileno	—	—	0,81
18	32,50	Trans-beta-cariofileno	11,82	4,19	—

TABELA 1

Quantificação e identificação dos componentes químicos presentes nos óleos essenciais de *Lippia sidoides*, de *Cymbopogon citratus* e de *Ocimum gratissimum*

(Conclusão)

Pico	RT*	Composto químico	<i>Lippia sidoides</i> (%)	<i>Cymbopogon citratus</i> (%)	<i>Ocimum gratissimum</i> (%)
19	33,25	<i>Alfa</i> -bergamoteno	0,23	0,17	—
20	34,00	<i>Alfa</i> -humuleno	1,03	0,33	—
21	35,05	<i>Alfa</i> -amorfenol	0,14	—	—
22	35,25	Germacreno-D	—	—	0,38
23	35,28	Germacreno D/ <i>alfa</i> -gurjuneno	1,45	0,65	—
24	35,49	<i>Beta</i> -selineno	0,22	—	—
25	35,76	Valenceno	0,18	—	—
26	35,88	Germacreno B	0,83	—	—
27	36,60	<i>Beta</i> -Bisaboleno	—	—	5,92
28	36,82	<i>Alfa</i> -panasiseno	0,68	—	—
29	37,11	<i>Delta</i> -cadineno	0,51	—	—
30	39,64	Óxido de cariofileno	0,99	—	—

Nota: * Tempo de Retenção.

Fonte: Elaborada pelo autor.

3.2 Avaliação do crescimento micelial e da produção de conídios de *Colletotrichum gloeosporioides*, em diferentes concentrações dos óleos essenciais

Para o crescimento micelial e a produção de conídios, verificou-se o efeito significativo da interação concentração *versus* espécie. O óleo essencial de *C. citratus* proporcionou a maior inibição do crescimento micelial, nas concentrações de 1 e 3 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, diferenciando-se dos demais óleos testados. A partir dessas concentrações, os óleos de *C. citratus* e de *L. sidoides* foram estatisticamente iguais. O óleo essencial de *O. gratissimum* apresentou menor efeito na redução do crescimento micelial do fungo, em todas as concentrações (TAB. 2).

TABELA 2

Índice de velocidade de crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*, em função das concentrações dos óleos essenciais de *Lippia sidoides*, de *Cymbopogon citratus* e de *Ocimum gratissimum*

Óleos	Concentração ($\mu\text{L.mL}^{-1}$)				
	0	1	3	5	7
<i>Lippia sidoides</i>	1,65	1,57 A	1,17 A	0,25 B	0,20 B
<i>Cymbopogon citratus</i>	1,68	0,83 B	0,36 B	0,00 B	0,00 B
<i>Ocimum gratissimum</i>	1,76	1,67 A	1,41 A	1,06 A	1,04 A
CV%	17,8				

Notas: Médias seguidas por mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade

Fonte: Elaborada pelo autor.

O óleo essencial de *C. citratus* reduziu a produção de conídios, sendo superior aos óleos de *L. sidoides* e de *O. gratissimum*, nas concentrações de 1 e 3 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, entretanto, nas demais concentrações testadas, o efeito foi semelhante para todos os óleos testados (TAB. 3).

TABELA 3

Número médio de conídios/cm² ⁽¹⁾ de *Colletotrichum gloeosporioides* em meio BDA com diferentes concentrações dos óleos essenciais de *Lippia sidoides*, de *Cymbopogon citratus* e de *Ocimum gratissimum*

Óleos	Concentração ($\mu\text{L.mL}^{-1}$)				
	0	1	3	5	7
<i>Lippia sidoides</i>	0,05	0,03 A	0,02 A	0,01 A	0,01 A
<i>Cymbopogon citratus</i>	0,04	0,01 B	0,00 B	0,00 A	0,00 A
<i>Ocimum gratissimum</i>	0,05	0,02 A	0,02 A	0,01 A	0,00 A
CV%	30,9				

Notas: ⁽¹⁾ Número de conídios x 10⁴

Médias seguidas por mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade

Fonte: Elaborada pelo autor.

As concentrações influenciaram no crescimento micelial do *C. gloeosporioides*, ajustando-se à equação do modelo linear. Observa-se um decréscimo no IVCM, à medida que foram aumentadas as concentrações dos óleos testados (GRAF. 1). Independente da concentração usada, o óleo de *C. citratus* foi o que mais reduziu o IVCM do patógeno e, já na concentração de 5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, o patógeno parou de crescer. Para o óleo de *O. gratissimum*, a diferença na redução do IVCM de uma concentração para outra foi muito pequena e, mesmo na maior concentração (7 $\mu\text{L.mL}^{-1}$), o seu efeito foi inferior à concentração de 1 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ do óleo de *C. citratus*. A *L. sidoides* reduziu o IVCM, a partir da concentração de 3 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ e, na concentração de 7 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, paralisou o crescimento do fungo.

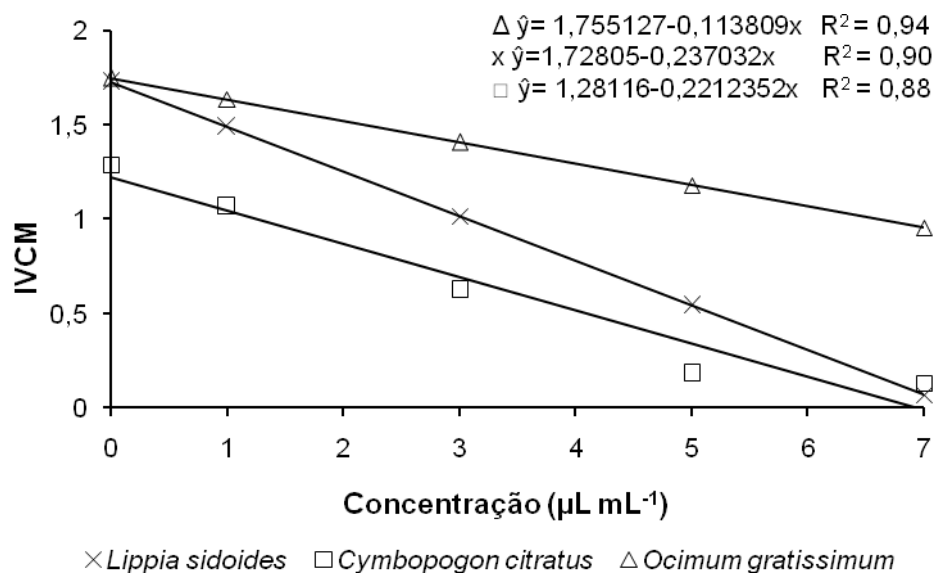


GRÁFICO 1- Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) do *Colletotrichum gloeosporioides*, em função das concentrações dos óleos essenciais de *Lippia sidoides*, de *Cymbopogon citratus* e de *Ocimum gratissimum*

Fonte: Elaborado pelo autor.

Alguns trabalhos têm demonstrado o potencial do óleo essencial de *C. citratus* como inibidor do crescimento micelial de fitopatógenos, como o de Souza Júnior *et al.* (2009), avaliando o efeito de óleos essenciais de cinco espécies vegetais, como, a *L. sidoides*, *C. citratus* e *O. gratissimum*, sobre o crescimento micelial de *C. gloeosporioides* do maracujazeiro-amarelo. Esses autores observaram que todas as concentrações dos óleos essenciais dessas plantas inibiram em 100% o crescimento micelial do fungo, a partir de $1\mu\text{L.mL}^{-1}$. Carnelossi *et al.* (2009), analisando o efeito de doses (1, 5, 10, 15, 25 e $50\mu\text{L}$) de óleos essenciais de quatro plantas medicinais no controle do *C. gloeosporioides* isolado do mamão, verificaram que o óleo de *C. citratus* foi o mais eficiente, inibindo o crescimento micelial em 100%, a partir da alíquota de $10\mu\text{L}$. Guimarães (2007), avaliando o efeito fungitóxico de *C. citratus*, observou que o óleo dessa planta inibiu, totalmente, o crescimento micelial de *C. gloeosporioides*, de *Fusarium oxysporum* e de *Rhizoctonia solani*. Anaruma *et al.* (2010), testando óleos essenciais de 28 plantas no

controle do *C. gloeosporioides*, concluíram que o óleo de *C. citratus* se destacou dos demais, como inibidor do crescimento micelial. Isso demonstra o potencial do óleo essencial de *C. citratus* na redução do crescimento micelial de fungos fitopatogênicos.

Rozwalka *et al.* (2008), testando extratos, decoctos e óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas, na inibição de *Glomerella cingulata* e de *C. gloeosporioides*, descrevem que os óleos essenciais de *Syzygium aromaticum* e *C. citratus* inibiram, totalmente o crescimento dos patógenos.

São poucos os trabalhos avaliando o efeito de óleos essenciais de *Lippia sidoides* e *Ocimum gratissimum* sobre fungos fitopatogênicos. Há alguns trabalhos avaliando os seus efeitos sobre bactérias (OLIVEIRA *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2010). Algumas pesquisas com o controle de fungos fitopatogênicos foram realizadas, testando-se outras espécies dos gêneros, como *Lippia alba* e *Ocimum basilicum* (ROZWALKA *et al.*, 2008; SHUKLA *et al.*, 2009).

As concentrações influenciaram na produção de conídios, ajustando-se à equação do modelo linear. Para todos os óleos avaliados, na medida em que se aumentaram as concentrações desses, houve decréscimo na produção de conídios (GRAF. 2). A partir da concentração de $3\mu\text{L.mL}^{-1}$, o óleo de *C. citratus* inibiu, completamente, essa produção.

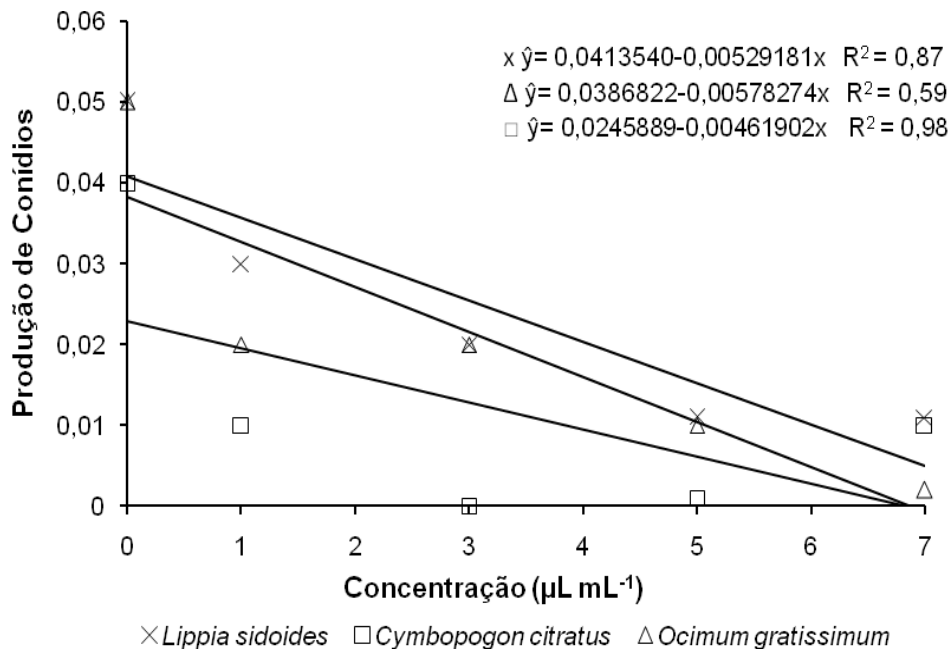


GRÁFICO 2 - Número de conídios/cm²(x10⁴), produzidos nas colônias de *Colletotrichum gloeosporioides*, em meio BDA, com diferentes concentrações dos óleos essenciais de *Lippia sidoides*, de *Cymbopogon citratus* e de *Ocimum gratissimum*

Fonte: Elaborado pelo autor.

Na literatura, são escassas as informações sobre o efeito de óleos essenciais sobre a produção de conídios de *C. gloeosporioides*. Há apenas o trabalho de Ribeiro e Bedendo (1999), que avalia extratos vegetais sobre esse patógeno, porém isolado de outro hospedeiro. Esses autores analisaram os extratos de alho, de hortelã, de mamona e de pimenta no controle de *C. gloeosporioides* isolado do mamoeiro e concluíram que os extratos aquosos de hortelã, de mamona e de pimenta, nas concentrações de 200 a 10000ppm, reduziram a produção de conídios de *C. gloeosporioides*. Ainda, segundo os autores, a redução foi maior, com o aumento das concentrações dos extratos.

3.3 Avaliação dos óleos essenciais de diferentes plantas medicinais, na germinação de conídios de *Colletotrichum gloeosporioides*

Na avaliação dos óleos essenciais na germinação dos conídios de *C. gloeosporioides*, verifica-se o efeito significativo da interação concentração *versus* espécie. Novamente, o óleo de *C. citratus* foi o mais eficiente, reduzindo a germinação de conídios de forma superior, na concentração 1 e $3\mu\text{L.mL}^{-1}$ e reduzindo, completamente a germinação, a partir da concentração de $3\mu\text{L.mL}^{-1}$ (TAB. 4). Porém os outros tratamentos inibiram a germinação, a partir da concentração de $5\mu\text{L.mL}^{-1}$.

TABELA 4

Percentagem de conídios germinados do *Colletotrichum gloeosporioides*, em função das concentrações dos óleos essenciais de *Lippia sidoides*, de *Cymbopogon citratus* e de *Ocimum gratissimum*

Óleos	Concentração ($\mu\text{L.mL}^{-1}$)				
	0	1	3	5	7
<i>Lippia sidoides</i>	95,7	61,2 A	39,2 A	0,00 A	0,00 A
<i>Cymbopogon citratus</i>	92,0	1,00 C	0,00 B	0,00 A	0,00 A
<i>Ocimum gratissimum</i>	92,0	37,0 B	39,7 A	0,00 A	0,00 A
CV%	18,99				

Nota: Médias seguidas por mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade

Fonte: Elaborada pelo autor.

As concentrações influenciaram na germinação, ajustando-se à equação do modelo linear. De maneira semelhante ao observado no teste de produção de conídios, houve decréscimo na germinação dos conídios, em todos os óleos avaliados, quando se aumentam as concentrações (GRAF. 3). A partir da concentração de $3\mu\text{L.mL}^{-1}$ do óleo de *C. citratus* e de $5\mu\text{L.mL}^{-1}$ dos outros óleos avaliados, observou-se a inibição completa da germinação dos conídios.

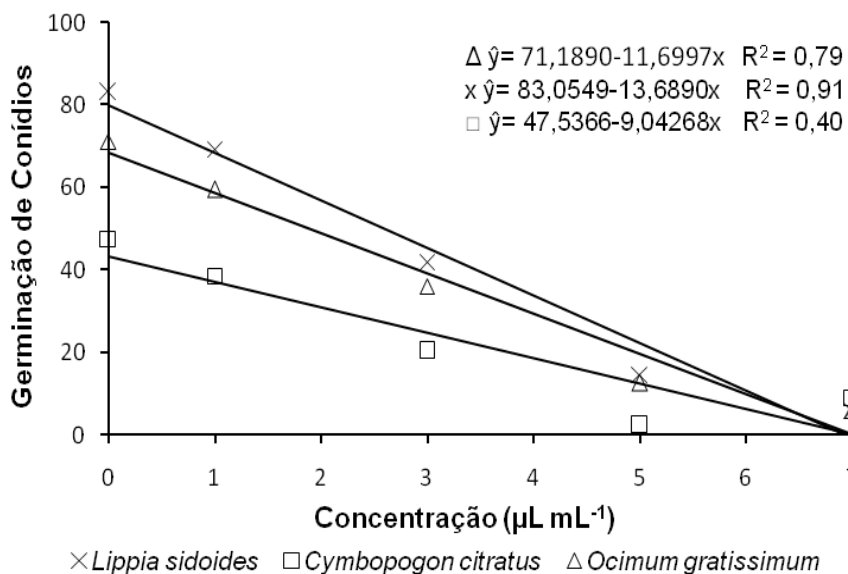


GRÁFICO 3 - Percentagem de conídios germinados do *Colletotrichum gloeosporioides*, em diferentes concentrações de óleos essenciais de *Lippia sidoides*, de *Cymbopogon citratus* e de *Ocimum gratissimum*

Fonte: Elaborado pelo autor.

Souza Júnior *et al.* (2009) e Silva *et al.* (2009), trabalhando com óleos essenciais brutos ou numa concentração superior às avaliadas nesta pesquisa, sobre o *C. gloeosporioides*, observaram que os óleos de *C. citratus*, de *L. sidoides* e de *O. gratissimum* inibiram a germinação de conídios em 100%.

Wilson *et al.* (1997), pesquisando o efeito de óleos essenciais, descrevem que os óleos de *Cymbopogon martinii* e *C. citratus* inibiram, totalmente, a germinação de esporos de *Botrytis cinerea*, até mesmo em baixas concentrações do óleo, 0,39 e 6,25%, respectivamente, mostrando, novamente, a potencialidade dessa planta contra o fungo estudado.

A inibição do crescimento micelial está relacionada ao efeito fungistático do produto empregado. A inibição da produção e a germinação dos esporos estão relacionadas ao efeito fungitóxico. A inibição da

germinação conidial é fundamental no controle das doenças, pois esse tipo de propágulo geralmente é o ponto inicial da infecção propriamente dita. Para o uso efetivo dos óleos essenciais e seu sucesso, é preciso que eles não apenas inibam o crescimento micelial do patógeno, mas também inibam a germinação de seus esporos (ABREU, 2006).

O grande potencial fungitóxico desses óleos pode estar relacionado à grande quantidade de componentes químicos, com ação antimicrobiana. Martins *et al.* (2002) sustentam que o timol apresenta ação bactericida e antifúngica. Garcia *et al.* (2008) afirmam que o citral apresenta um forte efeito fungistático e fungicida. Segundo Silva *et al.* (1999), o eugenol apresenta atividade antimicrobiana.

Pesquisas avaliando o efeito de cada componente desses óleos mostraram que a ação fungistática e fungicida relatada nesta pesquisa podem estar relacionadas aos componentes principais desses óleos. Assim, Montes–Belmont e Carvajal (1998) avaliaram o efeito do timol sobre o crescimento micelial do *Aspergillus flavus*, e encontraram inibição total desse patógeno. Garcia *et al.* (2008) testando o efeito do citral no crescimento micelial de *C. musae*, de *C. gloesporioides* e de *Fusarium subglutinans f.sp. ananás*, afirmam que esse componente inibiu completamente o crescimento micelial desses fungos. Kumar *et al.* (2009), ao testarem o eugenol no controle de 12 fitopatógenos, entre eles, o *C. gloesporioides*, afirmam que esse composto exibiu potente espectro antifúngico, inibindo todas as espécies de fungos avaliadas na menor concentração, sendo mais eficaz que fungicidas sintéticos testados. Faria *et al.* (2006) também confirmam o efeito do eugenol, na inibição do crescimento de *Alternaria sp.* e *Penicillium chrysogenum*.

4 CONCLUSÃO

Os constituintes químicos que apresentaram maior percentagem nos óleos de *Lippia sidoides*, de *Cymbopogon citratus* e de *Ocimum gratissimum* foram timol, citral e eugenol, respectivamente.

Todos os óleos essenciais avaliados apresentaram efeito fungitóxico e fungistático, entretanto aquele proveniente de *Cymbopogon citratus* proporcionou maiores reduções, independente da concentração.

O óleo essencial de *Cymbopogon citratus* apresentou maior redução no crescimento micelial, na produção e na germinação de conídios do *Colletotrichum gloeosporioides*.

O aumento das concentrações dos óleos essenciais avaliados reduziu, linearmente, o crescimento micelial, a produção e a germinação dos conídios do patógeno.

CAPÍTULO 3 - PATOGENICIDADE, MÉTODOS DE INOCULAÇÃO E AÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS NO MANEJO DA ANTRACNOSE, EM FRUTOS DE MARACUJAZEIRO-AMARELO

RESUMO

Objetivou-se, nesta pesquisa, avaliar dois métodos de inoculação de *Colletotrichum gloeosporioides* em maracujá, testar a patogenicidade de diferentes isolados, investigar a composição química de óleos essenciais de *Lippia sidoides*, de *Cymbopogon citratus* e de *Ocimum gratissimum*, bem como o efeito fungitóxico de concentrações do óleo dessas plantas sobre o fungo, por meio do tratamento dos frutos. Montou-se um ensaio em delineamento inteiramente casualizado, para avaliar a patogenicidade de seis isolados (Iso 1, Iso 2, Iso 3, Iso 4, Iso 5, e Iso 6) do *C. gloeosporioides*, com seis repetições. O segundo ensaio foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado e esquema fatorial 2x2, com dois métodos de inoculação (suspensão de conídios e disco de micélio) e dois estádios de desenvolvimento dos frutos (verdes e maduros) com seis repetições. As testemunhas constituíram-se de frutos inoculados apenas com água destilada esterilizada e frutos inoculados com disco de BDA. Após, avaliou-se a atividade antifúngica dos óleos essenciais no tratamento dos frutos. Para tanto, utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5x3+1, sendo cinco concentrações (0, 2, 4, 6 e 8 $\mu\text{L mL}^{-1}$) e três óleos essenciais, mais o tratamento com fungicida (tebuconazol), com cinco repetições. Fez-se a caracterização química dos óleos por cromatografia gasosa, com espectrometria de massas. Todos os isolados foram patogênicos, sendo o isolado 1 o mais agressivo, apresentando maior diâmetro das lesões, seguido pelos isolados 2 e 3. Os frutos maduros apresentaram maior diâmetro das lesões, quando inoculados com suspensão de conídios. O timol (30,24%), os isômeros *E*- e *Z*-citrinal (77,74%) e o eugenol (92,89%) foram componentes químicos com maior percentagem encontrados para *L. sidoides*, *C. citratus* e de *O. gratissimum*, respectivamente. Para o tratamento dos frutos, houve interação significativa da concentração *versus* espécie. O óleo de *C. citratus* proporcionou o menor diâmetro das lesões, até a concentração de 6 $\mu\text{L mL}^{-1}$, diferindo dos outros óleos testados. Os óleos de *L. sidoides* e *O. gratissimum* não diferiram-se entre si. Na concentração de 8 $\mu\text{L mL}^{-1}$, todos os óleos inibiram o desenvolvimento do fungo. Observou-se decréscimo no diâmetro das lesões, à medida que se aumentaram as concentrações dos óleos. O óleo de *C. citratus* apresentou maior efeito fungicida no controle do *C. gloeosporioides* nos frutos. Os óleos de *L. sidoides* e de *O. gratissimum* são eficientes, a partir da concentração de 8 $\mu\text{L mL}^{-1}$.

Palavras-chave: *Colletotrichum gloeosporioides*. *Passiflora edulis*. Antracnose. Óleos essenciais.

CHAPTER 3 - PATHOGENICITY, METHODS OF INOCULATION AND ACTION OF ESSENTIAL OILS IN THE MANAGEMENT OF ANTHRACNOSE, IN YELLOW PASSION FRUIT

ABSTRACT

The objective of this research was to evaluate two methods of inoculation of *Colletotrichum gloeosporioides* in passion fruit, to test the pathogenicity of different isolates, to investigate the chemical composition of essential oils of *Lippia sidoides*, of *Cymbopogon citratus* and of *Ocimum gratissimum*, as well the effect fungitoxic of oil concentrations of these plants on the fungus, by means of treatment of the fruits. It was set a trail up in completely randomized design to evaluate the pathogenicity of six isolates (Iso 1, Iso 2, Iso 3, Iso 4, Iso 5 and Iso 6) of the *C. gloeosporioides*, with six replications. The second trial was conducted in a completely randomized design and factorial scheme 2x2, with two inoculation methods (suspension of conidia and disc of mycelium) and two stages of fruits development (green and ripe) with six replications. The controls constituted of fruits inoculated only with sterilized water and inoculated fruits with discs of BDA. After, we evaluated the antifungal activity of essential oils in the treatment of the fruits. To this end, we used a completely randomized design in factorial scheme 5x3+1, being five concentrations (0, 2, 4, 6 and 8 $\mu\text{L mL}^{-1}$) and three essential oils, plus the treatment with fungicide (tebuconazole) with five replications. It was made the chemical characterization of oils by gas chromatography with mass spectrometry. All isolated were pathogenic, being the isolated 1 the most aggressive, showing larger diameter of the lesions, followed by isolated 2 and 3. The ripe fruits showed larger diameters of lesions when inoculated with conidial suspension. The thymol (30.24%), the isomers *E*- and *Z*-citral (77.74%) and eugenol (92.89%) were chemical compounds with the highest percentage found for *L. sidoides*, *C. citratus* and *O. gratissimum*, respectively. For the treatment of the fruits, there was a significant interaction of the concentration *versus* species. The oil of *C. citratus* proportioned the smallest diameter of the lesions until the concentration of 6 $\mu\text{L mL}^{-1}$, differing from the other oils tested. The oils of *L. sidoides* and *O. gratissimum* did not differ among themselves. In the concentration of 8 $\mu\text{L mL}^{-1}$, all the oils inhibited the fungal growth. We observed decrease in the diameter of the lesions, as it increased the concentrations of oils. The oil of *C. citratus* showed higher fungicidal effect in controlling *C. gloeosporioides* in the fruits. The oils of *L. sidoides* and *O. gratissimum* are efficient from the concentration of 8 $\mu\text{L mL}^{-1}$.

Keywords: *Colletotrichum gloeosporioides*. *Passiflora edulis*. Anthracnose. Essential oils.

1 INTRODUÇÃO

Entre as doenças que afetam o maracujá-amarelo, na fase de pós-colheita, a antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.), é a mais importante (RIBEIRO JÚNIOR; DIAS, 2005), por causar lesões na casca que comprometem a aparência (FISCHER *et al.*, 2007), além de afetar a polpa (PIO-RIBEIRO; MARIANO, 1997). Também acarreta grandes prejuízos à comercialização, devido à redução no consumo, pois a aparência é um dos parâmetros de avaliação qualitativa mais utilizados pelos consumidores (RIBEIRO JÚNIOR; DIAS, 2005).

As doenças de pós-colheita de frutos tropicais no Brasil são responsáveis por grandes perdas, atingindo 30%, antes de chegarem à mesa do consumidor, além disso, os frutos que chegam, nem sempre possuem a qualidade desejada (TAVARES, 2004). Segundo Pozza *et al.* (1999), os fungos são os microrganismos mais comuns causadores de deterioração em frutas, sendo responsáveis por 70% das doenças que causam danos em várias culturas, reduzindo a produtividade, em especial, nas regiões tropicais, favorecidos pela elevada temperatura e umidade (CHITARRA; CHITARRA, 1990).

Atualmente, no Brasil, não há disponibilidade de fungicidas registrados para o uso em pós-colheita do maracujá. Desse modo, surge a necessidade de desenvolvimento de métodos alternativos, como o uso de óleos essenciais no controle de patógenos pós-colheita. Alguns trabalhos já foram realizados com outras frutíferas e os resultados mostram-se promissores para a utilização no controle de patógenos de pós-colheita em banana (BASTOS; ALBUQUERQUE, 2004), em manga (ROGNIER *et al.*, 2008), em goiaba (ROZWALKA *et al.*, 2008), em mamão (CARNELOSSI *et al.*, 2009) e em abacate (ROGNIER *et al.*, 2010), entretanto não há ainda, pesquisas relacionadas ao uso de óleos essenciais no controle pós-colheita da antracnose em maracujá-amarelo.

Na literatura, são escassas as informações sobre a avaliação da patogenicidade em maracujá de diferentes isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, provenientes de distintas regiões. Alguns trabalhos (LIMA

FILHO, *et al.*, 2003; PERES *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2006) avaliaram a patogenicidade cruzada desse patógeno em diferentes espécies frutíferas, incluindo o maracujá, porém os isolados foram obtidos apenas de uma região. Dessa forma, é importante a realização de testes que avaliem a patogenicidade de diferentes isolados obtidos em distintas regiões, pois o conhecimento desses dados servirá de subsídios para pesquisas que visem a minimizar os prejuízos causados por esse patógeno, por meio de métodos de controle menos agressivos ao meio ambiente.

Para a realização de estudos sobre o controle da antracnose durante a fase de pós-colheita, torna-se necessário desenvolver uma metodologia de inoculação que promova as condições ótimas para a infecção pelo patógeno. Sabe-se que o hospedeiro exerce forte influência sobre o sucesso ou o fracasso da infecção pelo patógeno, motivo pelo qual deve ser investigada a influência dos métodos de inoculação e estágio de maturação do hospedeiro na severidade da doença (GOMES, 2008; SENHOR *et al.*, 2008). É oportuno ressaltar que, embora existam metodologias de inoculação de *C. gloeosporioides* em frutos de maracujá-amarelo, não há investigação relacionada ao estágio de maturação dos frutos.

Diante do exposto, a presente pesquisa teve os objetivos: avaliar dois métodos de inoculação de *C. gloeosporioides* em maracujá, associados ao estágio de maturação; testar a patogenicidade de diferentes isolados; investigar a composição química dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* de *Cymbopogon citratus* e de *Ocimum gratissimum*, bem como avaliar o efeito fungitóxico de concentrações do óleo dessas plantas sobre o patógeno, por meio do tratamento dos frutos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Fitopatologia do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais, em Montes Claros.

2.1 Patogenicidade de diferentes isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* em frutos maduros de maracujazeiro-amarelo

Os isolados de *C. gloeosporioides* foram obtidos a partir de lesões características de antracnose do maracujazeiro-amarelo, em distintas partes da planta, provenientes de diferentes pomares, conforme metodologia preconizada por Alfenas e Mafia (2007). Os isolados (Iso 1; Iso 2 e Iso 3) foram obtidos de folhas, de fruto e de haste, respectivamente, no pomar experimental da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, em Seropédica-RJ. O Iso 4, foi obtido de lesões em fruto, colhido no pomar experimental do ICA. O Iso 5 e o Iso 6 foram obtidos da folha e da haste, respectivamente, coletadas na Comunidade de Abóboras (zona rural de Montes Claros). A cultura pura dos isolados foi cultivada em meio BDA, durante oito dias.

Frutos sadios foram colhidos no pomar experimental do ICA, levados ao laboratório e lavados com detergente e água de torneira. Em seguida, foram imersos em solução de hipoclorito de sódio 2% (v/v), por um minuto e novamente, lavados três vezes em água destilada estéril. Após, foram dispostos na câmara de fluxo laminar, até a completa secagem.

Depois de secos, efetuaram-se cinco orifícios de aproximadamente 2mm de profundidade na parte mediana dos frutos, com o auxílio de uma pinça metálica flambada. Em seguida, os frutos foram inoculados, depositando-se, sobre os orifícios, 50µL da suspensão de conídios, ajustada para uma concentração de 2×10^5 conídios.mL⁻¹. Após, todos os frutos foram acondicionados em caixas plásticas de 30x15x6cm, onde foram submetidos à câmara úmida, por 72 horas, com o auxílio de um filme plástico e um chumaço de algodão, umedecido com água destilada estéril. As bandejas foram incubadas em câmara de crescimento (BOD), à temperatura de 25°C, com 12 horas de fotoperíodo. Decorrido esse período, a câmara úmida foi desfeita e os frutos permaneceram incubados na BOD, até o décimo dia, para a reprodução dos sintomas.

O ensaio foi realizado seguindo o delineamento inteiramente casualizado, onde se testaram os seis isolados (Iso 1, Iso 2, Iso 3, Iso 4, Iso 5 e Iso 6) do *C. gloeosporioides* com seis repetições.

A avaliação foi realizada medindo-se o diâmetro das lesões em dois sentidos opostos, com o auxílio de um paquímetro. Após o reisolamento do fungo, comparou-se a colônia obtida com aquela utilizada como inóculo, confirmando a presença do *C. gloeosporioides*.

Os dados foram submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,01$), conforme Banzatto e Kronka (2006).

2.2 Métodos de inoculação de *Colletotrichum gloeosporioides*, em frutos verdes e maduros

Após a seleção do isolado, foi conduzido o segundo ensaio, utilizando-se apenas o Iso 1, por ter sido o mais agressivo. Foi montado o ensaio em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x2, com dois métodos de inoculação (suspensão de conídios e disco de micélio) e dois estádios de desenvolvimento dos frutos com casca verde e casca amarela, com seis repetições. Para o método de suspensão de conídios, os frutos foram inoculados, depositando-se, sobre os orifícios, 50 μ L da suspensão ajustada para uma concentração de 2×10^5 conídios.mL⁻¹. Para o método de disco de micélio, os frutos foram inoculados, depositando-se um disco de micélio de 5mm de diâmetro, retirado das bordas da colônia da cultura monospórica, com oito dias. As testemunhas constituíram-se de frutos inoculados apenas com água destilada esterilizada e frutos inoculados apenas com um disco de BDA. Foram determinados como verdes os frutos que se encontravam completamente formados, porém com a casca totalmente verde. Os frutos fisiologicamente maduros foram os que apresentavam a casca totalmente amarela, com 0% de perda de volume, conforme escala de desidratação e coloração da casca proposta por Motta (1999). O local de coleta, a desinfestação dos frutos, o período e as

condições de incubação, bem como as avaliações foram realizadas, como descrito no item 2.1.

Os dados foram submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,01$), conforme Banzatto e Kronka (2006).

2.3 Avaliação de diferentes concentrações dos óleos essenciais no desenvolvimento da lesão de antracnose, em maracujá-amarelo

O ensaio foi montado em delineamento inteiramente casualizado e esquema fatorial $5 \times 3 + 1$, onde foram utilizadas cinco concentrações (0, 2, 4, 6, e $8 \mu\text{L.mL}^{-1}$) dos óleos essenciais de três plantas medicinais [*Lippia sidoides* Cham., *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. e *Ocimum gratissimum* L.), mais o tratamento com fungicida Folicur 200 EC (100mL.100L^{-1}), com cinco repetições. A testemunha constitui-se no tratamento com água destilada estéril. As concentrações dos óleos essenciais foram obtidas conforme descrito no item 2.2 do capítulo 2.

Os frutos sadios de maracujazeiro-amarelo utilizados foram colhidos, quando apresentavam a casca totalmente amarela e sem perda de volume. Os frutos foram desinfestados conforme descrito no item 2.1. Após a inoculação, os frutos foram submetidos à câmara úmida, por 24 horas e incubados da mesma forma, como descrito no item 2.1.

Decorrido esse período, procedeu-se, então, aos tratamentos dos frutos pela imersão, durante dois minutos, em béqueres de vidro de 500mL, com um volume da solução de óleo de cada tratamento, suficiente para cobri-los completamente e sob agitação constante. Após o tratamento, os frutos foram levados à câmara úmida e permaneceram por mais 48 horas. Posteriormente, continuaram incubados por mais cinco dias, até o período de avaliação.

As avaliações foram realizadas dez dias após a inoculação com o fungo determinando-se o diâmetro das lesões nos dois sentidos opostos, com o auxílio de paquímetro. Calcularam-se as médias do desenvolvimento da lesão por fruto.

Os dados foram submetidos à análise de variância e, posteriormente, quando qualitativos, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) e, quando quantitativos, por regressão polinomial ($p < 0,01$), conforme Banzatto e Kronka (2006).

2.4 Análise cromatográfica dos óleos essenciais obtida das plantas (*Lippia sidoides*, *Cymbopogon citratus* e *Ocimum gratissimum*)

As análises cromatográficas dos óleos essenciais foram realizadas no Laboratório de Análise e Síntese de Agroquímicos da Universidade Federal de Viçosa. A análise consistiu na identificação e na quantificação dos componentes do óleo essencial por cromatografia gasosa, acoplada com espectrometria de massas (CG-EM), de acordo com a metodologia descrita por Adams (1995).

Os óleos essenciais foram extraídos por arraste por vapor de água, utilizando-se o destilador piloto (Linax®, modelo D20). As plantas foram escolhidas a partir da seleção em dois outros estudos (SILVA *et al.*, 2009; SOUZA JÚNIOR *et al.*, 2009). Para isso, coletaram-se 5kg de folhas de cada espécie medicinal: alecrim-pimenta (*Lippia sidoides*), capim santo (*Cymbopogon citratus*) e alfavaca cravo (*Ocimum gratissimum*), no período da manhã (07h30min). No Laboratório de Plantas Medicinais do ICA, as plantas foram acondicionadas no destilador, para a extração do óleo essencial, durante 3 horas. Após esse processo, o óleo foi separado do hidrolato, por partição líquido-líquido e retirado com micropipeta, sendo o óleo armazenado em frasco âmbar envolto com papel alumínio, mantendo-o sobre refrigeração (5°C).

Amostras (2,0mg) dos óleos foram pesadas em um vial para a derivatização (próprio para este processo) e, em seguida, dissolvidas em 60µL de piridina e 100µL de BSTFA ((N,O-bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamida) contendo 44,1% de cloro-trimetilsilano. A mistura reacional foi aquecida a 70°C, por 30min, em banho-maria. Da solução obtida, apenas 1µL foi injetado no CG-EM, sendo o procedimento realizado em triplicata.

As análises foram realizadas no aparelho CG-EM PQ5050A, da marca Shimadzu, utilizando-se coluna capilar de sílica fundida DB-5 (5% de difenil e 95% dimetilsiloxano), com 30m de comprimento, 0,25mm de diâmetro interno, filme de 0,25µm e hélio como gás de arraste. As condições cromatográficas foram as seguintes: a temperatura do injetor foi de 290°C, iniciando com 80°C, por 5 minutos, aumentando de 80°C a 290°C, na razão de 4°C/min. A temperatura final permaneceu em 290°C, por 40 minutos. A temperatura do detector e da interface do sistema CG-EM foi de 290°C. O detector de massas operou com ionização por impacto de elétrons de 70 eV e varredura de massas de 30 a 600 m/z (SILVÉRIO *et al.*, 2008).

A identificação dos componentes dos óleos foi realizada por comparação dos espectros de massas do banco de dados do aparelho (Wiley 330.000) com dados da literatura e também com injeção de amostras de substâncias-padrão. Também foi utilizado o índice de Kovats, para a confirmação da identificação dos compostos. A quantificação dos componentes do óleo essencial foi realizada em cromatógrafo a gás com detector, por ionização em chamas (CG-FID).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Patogenicidade de diferentes isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* em frutos maduros de maracujazeiro-amarelo

Todos os isolados testados foram patogênicos, provocaram lesões nos frutos do maracujazeiro-amarelo (TAB. 1). O isolado 1 foi o mais agressivo, apresentando maior diâmetro médio das lesões, seguido pelos isolados 2 e 3. Os demais isolados (4, 5 e 6) não diferiram entre si, quanto ao diâmetro das lesões nos frutos (TAB. 1).

TABELA 1

Médias dos diâmetros das lesões de antracnose, em frutos maduros de maracujazeiro-amarelo, causadas pelos diferentes isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*

ISOLADOS	DIÂMETRO DAS LESÕES
Iso 1	4,08 A
Iso 2	2,46 B
Iso 3	2,08 B
Iso 4	1,86 C
Iso 5	1,75 C
Iso 6	1,25 C
CV %	18,3

Nota: Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 1% de probabilidade

Fonte: Elaborada pelo autor.

Andrade *et al.* (2007), caracterizando 33 isolados de *C. gloeosporioides* mamão, descreveram que todos foram patogênicos, produzindo sintomas característicos de antracnose aos nove dias após a inoculação. Além disso, houve variação no diâmetro e na intensidade das lesões formadas, indicando níveis diferentes de agressividade entre os isolados, assemelhando-se aos resultados observados nesta pesquisa.

Pereira *et al.* (2006) observaram que essas diferenças de agressividade entre os isolados podem ser explicadas por fatores externos, como as diferenças edafoclimáticas das regiões de onde procederam os isolados, ou internos, em que uma espécie difere de outra e um isolado dentro da mesma espécie difere de outro, devido à sua composição genética. Para Almeida e Coêlho (2007), a demonstração da existência de isolados de *Colletotrichum* spp. com maior agressividade que outros constitui informação importante para que sejam usados os de maior agressividade em programas de seleção de maracujazeiro, visando à resistência à antracnose.

3.2 Métodos de inoculação de *Colletotrichum gloeosporioides*, em frutos verdes e maduros

Houve efeito significativo da interação estágio de maturação dos frutos *versus* métodos de inoculação. Os frutos maduros apresentaram maior diâmetro das lesões, quando foram inoculados com a suspensão de conídios, diferindo-se dos frutos verdes (TAB. 2). Entretanto, quando se utilizou o disco de micélio, não se observou diferença no diâmetro das lesões nos frutos maduros e verdes.

TABELA 2

Médias dos diâmetros das lesões de antracnose, em frutos de maracujazeiro-amarelo, resultantes da inoculação de *Colletotrichum gloeosporioides* em frutos com diferentes estágios de maturação, utilizando-se duas metodologias de inoculação

FRUTOS	MÉTODOS DE INOCULAÇÃO	
	Suspensão de conídios	Disco de micélio
Maduros	4,17 Aa	2,08 Ab
Verdes	2,08 Ba	1,58 Aa
Testemunha	0,00 Ca	0,00 Ba
CV %	24,5	

Nota: Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade

Fonte: Elaborada pelo autor.

A doença se progrediu rapidamente nos frutos maduros, quando inoculados com suspensão de conídios, entretanto, para o disco de micélio, não ocorreu o mesmo comportamento. O diâmetro das lesões é semelhante para os dois tipos de frutos até o quinto dia após a inoculação, porém, a partir daí, houve paralisação do crescimento do fungo nos frutos verdes, quando inoculados pelos dois métodos, corroborando com Pessoa *et al.* (2007), que observaram que bananas (*Musa* spp.), em estágio de maturação mais elevado, foram altamente suscetíveis à infecção por *Colletotrichum musae*, enquanto os frutos verdes apresentam maior resistência a infecção. Oliveira *et al.* (2008), ao investigarem o efeito do estágio de maturação, do tipo de

inóculo e do local de inoculação de *Lasiodiplodia theobromae* e de *Fusicoccum parvum*, na severidade da podridão em manga, concluíram que, independente do método de inoculação, as lesões apresentaram diâmetros crescentes, à medida que o estágio de maturação avançava.

De acordo com Moreira (2005), os riscos que conduzem os frutos à podridão, são maiores nos estágios finais, coincidentes com a fase de maturação dos frutos, que, nos estágios iniciais do ciclo da cultura, isso ocorre, devido aos frutos maduros apresentam maiores teores de açúcares, disponíveis para o fungo, permitindo desenvolvimento dos patógenos (GOMES, 2008). Já quando o fruto está imaturo, o fungo penetra e emite uma hifa subcuticular, entretanto não se desenvolve, devido às condições adversas do fruto (DICKMAN; ALVAREZ, 1983), como a presença de taninos e outras substâncias tóxicas (BRUTON, 1994; LOPEZ, 2001), a presença de fitoalexinas (CHITARRA; CHITARRA, 1990). Além disso, os requerimentos nutricionais do patógeno são comprometidos, devido à composição dos frutos imaturos, sendo o requerimento de energia para o fungo atendido somente após o amadurecimento. Outro fato importante é o potencial enzimático do fungo ser insuficiente para invadir o fruto imaturo (BRUTON, 1994).

Na literatura, há resultados controversos sobre o melhor método de inoculação de *C. gloeosporioides* em frutos. Como observado nesta pesquisa, Gomes (2008), avaliando diferentes métodos de inoculação de *C. gloeosporioides* em frutos de mamão, em diferentes estágios de maturação, encontrou maior diâmetro das lesões de antracnose nos frutos com 25 e 50% da casca amarela, feridos com agulhas em cinco pontos equidistantes e inoculados com suspensão de conídios. Segundo Alves (2009), o uso do método de inoculação, por suspensão de conídios apresenta a vantagem de padronização da quantidade de inóculo depositada sobre a superfície do hospedeiro, o que também foi observado nesta pesquisa. Por outro lado, Silva (2005), avaliando a agressividade de *C. gloeosporioides* em manga, em mamão, em maracujá e em goiaba, na pós-colheita, obteve maiores diâmetros das lesões com, a inoculação com disco de micélio do patógeno, em frutos maduros de cada espécie.

3.3 Avaliação de diferentes concentrações dos óleos essenciais, no desenvolvimento da lesão de antracnose em maracujá-amarelo

Com relação ao tratamento dos frutos, houve o efeito significativo da interação concentração *versus* espécie. As concentrações influenciaram o desenvolvimento da antracnose nos frutos, ajustando-se à equação do modelo linear. Observa-se um decréscimo no diâmetro das lesões, à medida que se aumentam as concentrações dos óleos testados (GRAF. 1). O óleo essencial de *C. citratus* proporcionou o menor diâmetro das lesões da doença, até a concentração de $6\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$, diferindo-se dos demais. Os óleos de *L. sidoides* e de *O. gratissimum* não diferiram estatisticamente entre si em todas as concentrações testadas. Na concentração de $8\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$, todos os óleos testados inibiram, completamente, o desenvolvimento do fungo e, conseqüentemente, o surgimento das lesões da doença. Nos frutos onde se utilizou o fungicida, não houve aparecimento dos sintomas da doença.

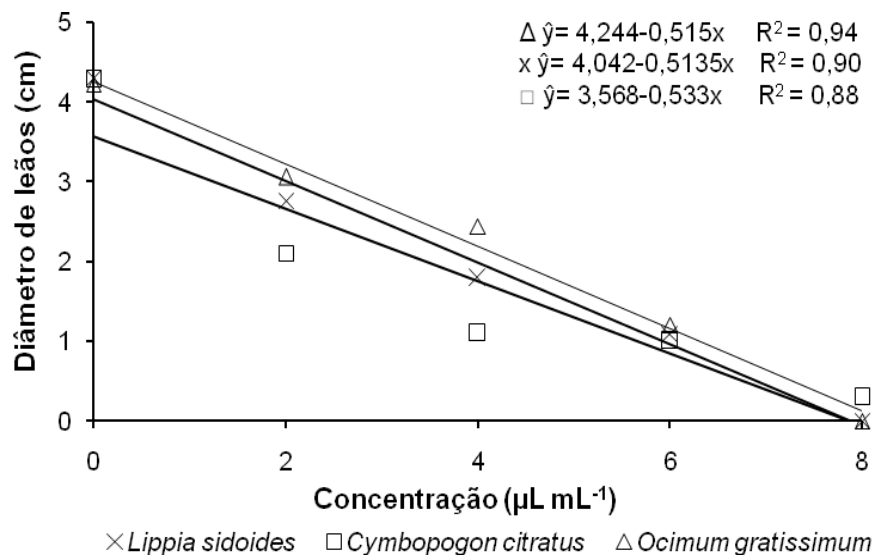


GRÁFICO 1 - Diâmetro das lesões de antracnose em frutos de maracujazeiro-amarelo, em função das concentrações dos óleos essenciais de *Lippia sidoides*, de *Cymbopogon citratus* e de *Ocimum gratissimum*

Fonte: Elaborado pelo autor.

Independente da concentração usada, o óleo de *C. citratus* foi o que mais reduziu as lesões provocadas pelo patógeno e já na concentração de $6\mu\text{L.mL}^{-1}$, não se observou o aparecimento da doença. Os óleos de *L. sidoides* e de *O. gratissimum* reduziram o diâmetro, à medida que se aumentavam as concentrações, porém a redução foi pequena em relação ao óleo de *C. citratus*.

Anaruma *et al.* (2010), testando óleos essenciais de 28 plantas no controle do *C. gloeosporioides*, concluíram que o óleo de *C. citratus* foi tão eficiente quanto o fungicida imidazole, já nas primeiras concentrações, destacando-se dos demais no controle da antracnose do maracujazeiro, sem causar distúrbios fisiológicos, o que também foi observado nesta pesquisa. Isso demonstra o potencial dessa planta no controle pós-colheita de fungos fitopatogênicos. Ainda, segundo esses autores, pelo fato de o *C. citratus* apresentar um bom rendimento de óleo essencial, favorece a sua utilização no controle pós-colheita de patógenos.

Carnelossi *et al.* (2009), testando óleos essenciais no controle pós-colheita de *C. gloeosporioides* em mamão, encontraram a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para os frutos tratados e inoculados imediatamente. A menor AACPD foi verificada no tratamento com *C. citratus*, *Eucalyptus citriodora*, demonstrando que a doença foi menos severa, quando os frutos foram tratados com esses óleos. Já para o progresso da doença dos frutos tratados e inoculados após 24h, a menor AACPD foi observada no tratamento com *C. citratus*.

Bastos e Albuquerque (2004), avaliando o efeito do óleo de *Piper aduncum* no controle em pós-colheita do *C. musae* em banana, concluíram que o controle da doença foi obtido com o óleo a 1,0%, controlando o patógeno semelhante ao controle químico.

Na literatura, são escassos trabalhos com o uso de *L. sidoides* e *O. gratissimum* em tratamentos pós-colheita de frutas. Um dos trabalhos existentes é o de Gadelha *et al.* (2003), testando defensivos naturais no tratamento pós-colheita de pedúnculo de melão. Esses autores encontraram melhores resultados na prevenção da proliferação de fungos, com uma mistura de óleos essenciais, entre eles, o óleo de *L. sidoides* e *O.*

gratissimum. À medida que se aumentava a concentração dos óleos, ocorreu a redução nessa proliferação.

Óleos essenciais de outras plantas também já foram testados no controle pós-colheita de patógenos. Molina *et al.* (2010), avaliando o efeito inibitório de óleos essenciais de *Citrus aurantifolia* (0,14%) e *Thymus vulgaris* (0,15%), no controle de *C. gloeosporioides* e *Rhizopus stolonifer* em frutos de mamão, observaram redução de 50 e 40% na incidência dos dois patógenos, respectivamente.

O efeito dos óleos no controle de patógenos pode estar ligado à composição química desses óleos. Assim, pois Svircev *et al.* (2007), testando timol no tratamento pós-colheita de ameixas, visando ao controle de *Monilinia fructicola*, encontraram redução de 50% na viabilidade dos esporos inoculados nos frutos. Valero *et al.* (2006) observaram redução de 50% na podridão em uva, também com o uso do timol. Klieber *et al.* (2002), pesquisando o efeito do citral no controle de *Penicillium digitatum*, *P. italicum* e *Geotrichum candidum*, conseguiram inibir, completamente o aparecimento desses fungos em citrus. Amiri *et al.* (2008) conseguiram redução de até 90% na incidência de quatro patógenos pós-colheita de duas cultivares de maçãs tratadas com diferentes formulações de eugenol.

3.4 Análise cromatográfica dos óleos essenciais obtida das plantas (*Lippia sidoides*, *Cymbopogon citratus* e *Ocimum gratissimum*)

Foram detectados 24 compostos no óleo essencial do *L. sidoides* (FIG. 1). Dentre eles, destacam-se o timol (30,24%), o benzeno (14,49%), o *trans*-beta-cariofileno (11,82%), o borneol (11,38%), o metil timil éter (8,32%) e o *gamma*-terpineno (8,05%). Os principais constituintes do óleo de *C. citratus* foram; os isômeros *E*-citral (43,69%) e *Z*-citral (34,05%), o *beta*-mirceno (15,11%), o *trans*-beta-cariofileno (4,19%), entre outros. Para o óleo essencial de *O. gratissimum*, o eugenol foi o constituinte químico com predomínio (92,89%), seguido pelo *beta*-bisaboleno (5,92%) (TAB. 3).

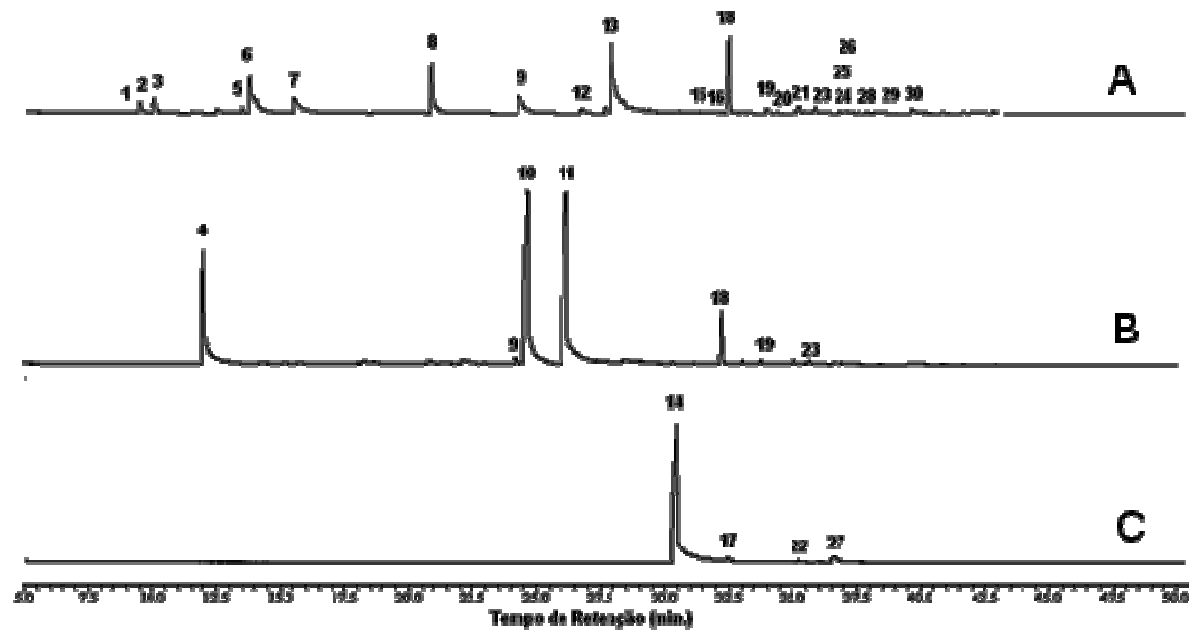


FIGURA 1 - Perfis cromatográficos dos óleos essenciais:
 (A) *Lippia Sidoides*
 (B) *Cymbopogon citratus*
 (C) *Ocimum gratissimum*

Fonte: Elaborada pelo autor.

TABELA 3

Quantificação e identificação dos componentes químicos presentes nos óleos essenciais de *Lippia sidoides*, de *Cymbopogon citratus* e de *Ocimum gratissimum*

Pico	RT*	Composto químico	<i>Lippia sidoides</i> (%)	<i>Cymbopogon citratus</i> (%)	<i>Ocimum gratissimum</i> (%)
1	9,35	Felandreno	0,07	—	—
2	9,48	<i>Alfa</i> -pineno	1,92	—	—
3	10,08	Canfeno	3,76	—	—
4	12,50	<i>Beta</i> -mirceno	0,94	15,11	—
5	13,46	<i>Alfa</i> -terpineno	1,16	—	—
6	13,83	Benzeno	14,49	—	—
7	15,56	<i>Gama</i> -terpineno	8,05	—	—
8	20,93	Borneol	11,38	0,42	—
9	24,33	Metil timid éter	8,32	—	—
10	24,93	<i>Z</i> -citral	—	34,05	—
11	26,43	<i>E</i> -citral	—	43,69	—
12	26,75	Acetato de bornila	1,14	—	—
13	27,95	Timol	30,24	—	—
14	30,47	Eugenol	—	—	92,89
15	30,56	<i>Alfa</i> -cubebeno	0,29	—	—
16	31,37	<i>Beta</i> -elemeno	0,16	—	—
17	32,46	<i>Trans</i> -Cariofileno	—	—	0,81
18	32,50	<i>Trans</i> -beta-cariofileno	11,82	4,19	—
19	33,25	<i>Alfa</i> -bergamoteno	0,23	0,17	—
20	34,00	<i>Alfa</i> -humuleno	1,03	0,33	—
21	35,05	<i>Alfa</i> -amorfenol	0,14	—	—
22	35,25	Germacreno-D	—	—	0,38
23	35,28	Germacreno D/alfa-gurjuneno	1,45	0,65	—
24	35,49	<i>Beta</i> -selineno	0,22	—	—
25	35,76	Valenceno	0,18	—	—
26	35,88	Germacreno B	0,83	—	—
27	36,60	<i>Beta</i> -Bisaboleno	—	—	5,92
28	36,82	<i>Alfa</i> -panasiseno	0,68	—	—
29	37,11	<i>Delta</i> -cadineno	0,51	—	—
30	39,64	Óxido de cariofileno	0,99	—	—

Nota: * Tempo de Retenção

Fonte: Elaborada pelo autor.

Craveiro *et al.* (1981) também relatam o timol (60%) como principal constituinte do óleo de *L. sidoides*, valor bem acima do encontrado na presente pesquisa, indicando que há quimiótipos na espécie: já para o *Trans*-beta-cariofileno (10%), os valores são próximos aos observados nesta pesquisa. Craveiro *et al.* (1981), trabalhando com o óleo essencial de *C. citratus*, identificaram alto teor de citral (80%) e mirceno (16%), o que também foi observado nesta pesquisa. Entretanto Pereira *et al.* (2008), em estudo com a mesma espécie, observaram o neral (40,2%), geranial (31,8%), que, isomericamente, formam o citral, o mirceno (19,7%), o neo-mentol (1,1), o acetato de linalila (0,4%), o *Z*-ocimeno (1,1%) e o *E*-ocimeno (1,4%). Franco *et al.* (2007), avaliando a composição química do óleo de *O. gratissimum*, observaram também o predomínio de eugenol, entretanto com percentual bastante inferior (57,82%) ao observado nesta pesquisa. Algumas variações justificam-se em razão da época de plantio, do tipo de solo, do clima, dos aspectos genéticos da planta, além do método de extração do óleo.

4 CONCLUSÃO

Nos frutos maduros inoculados com suspensão de conídios, o fungo se desenvolve mais rápido, quando comparados com frutos verdes.

O isolado 1 é o mais agressivo, quando inoculado nos frutos de maracujazeiro-amarelo.

Os componentes majoritários nos óleos de *Lippia sidoides*, de *Cymbopogon citratus* e de *Ocimum gratissimum* são: timol, citral e eugenol, respectivamente.

O óleo essencial de *Cymbopogon citratus* apresenta o maior efeito fungicida no controle do *Colletotrichum gloeosporioides* nos frutos. Os óleos de *Lippia sidoides* e de *Ocimum gratissimum* são eficientes em concentrações maiores que $8\mu\text{L.mL}^{-1}$.

O óleo essencial de *Cymbopogon citratus*, na concentração de $6\mu\text{L.mL}^{-1}$ e os óleos de *Lippia sidoides* e *Ocimum gratissimum*, na concentração de $8\mu\text{L.mL}^{-1}$ são tão eficientes no controle pós-colheita do patógeno quanto o fungicida tebuconazol.

REFERÊNCIAS

- ABREU, C. L. M. **Controle de *Alternaria solani* em tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) com óleos essenciais**. 2006. 82 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, SP, 2006.
- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography mass spectroscopy**. Carol Stream, Ill.:Allured Publishing, 1995. 469 p.
- ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em fitopatologia**. Viçosa: UFV, 2007. 382 p.
- ALMEIDA, L. C. C.; COELHO, R. S. B. Caracterização da agressividade de isolados de *Colletotrichum* de maracujá amarelo com marcadores bioquímico, fisiológico e molecular. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 32, n. 4, p. 318-328, 2007.
- ALVES, M. Z. **Epidemiologia da podridão negra do abacaxi e efeito de extratos vegetais no manejo da doença**. 2009. 61 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, 2009.
- AMIRI, A.; DUGAS, R.; PICHOT, A. L.; BOMPEIX, G. In vitro and in vitro activity of eugenol oil (*Eugenia caryophyllata*) against four important postharvest apple pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 126, n. 2, p. 13–19, 2008.
- ANARUMA, N. D.; SCHMIDT, F. L.; DUARTE, M. C. T.; FIGUEIRA, G.M.; DELARMEINA, C.; BENATO, E. A.; SARTORATTO, A. Control of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. in yellow passion fruit using *Cymbopogon citratus* essential oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 41, n. 1, p. 66-73, 2010.
- ANDRADE, E. M., UESUGI, C. H., UENO, B.; FERREIRA, M. A. S. V. Caracterização morfocultural e molecular de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* patogênicos ao mamoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 32, n. 1, p. 21-31, 2007.
- BANZATTO, D. A.; KRONKA, S. N. **Experimentação agrícola**. 4. ed. Jaboticabal: Funep, 2006. 237 p.
- BARKAI-GOLAN, R. **Postharvest diseases of fruits and vegetables: development and control**. Amsterdam: Elsevier, 2001. 418 p.

BASTOS, C. N.; ALBUQUERQUE, S. B. Efeito do óleo de *Piper aduncum* no controle em pós-colheita de *Colletotrichum musae* em banana. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 29, n. 5, p. 555-557, 2004.

BEDENDO, I. P. Podridão de órgãos de reserva. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.) **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. , v.1., p. 810-819.

BENATO, E. A.; SIGRIST, J. M. M.; HANASHIRO, M. M.; MAGALHÃES, M. J. M.; BINOTTI, C. S. Avaliação de fungicidas e produtos alternativos no controle de podridões pós-colheita em maracujá-amarelo. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 28, n. 4, p. 299-304, 2002.

BETTIOL, W. Métodos alternativos para o controle de doenças de plantas. In: MICHEREFF, S. J.; BARROS, R. (Ed.) **Proteção de plantas na agricultura sustentável**. Recife-PE: UFRPE, Imprensa Universitária, 2001. 368 p.

BOTSARIS, A. S. **Fitoterapia chinesa e plantas brasileiras**. São Paulo: Ícone, 1995. 550 p.

BRUTON, B. D. Mechanical injury and latent infections leading to postharvest decay. **HortScience**, Alexandria, v. 29, n. 7, p. 747-749, 1994.

CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W. Panorama sobre o uso de agrotóxicos no Brasil. In: CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W. (Ed.) **Métodos alternativos de controle fitossanitário**. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 2003. p.13-50.

CAMPOS, A. J.; MANOEL, L.; DAMATTO JÚNIOR, E. R.; VIEITES, R. L.; LEONEL, S.; EVANGELISTA, R. M. Tratamento hidrotérmico na manutenção da qualidade pós-colheita de maracujá-amarelo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 27, n. 3, p. 383-385, 2005.

CARDOSO, M. G.; GAVILANES, M. L.; MARQUES M. C. S.; SHAN, A. Y. K. V.; SANTOS, B. R.; OLIVEIRA, A. C. B.; BERTOLUCCI, S. K. V.; PINTO, A. P. S. **Óleos essenciais**. Boletim Técnico, Série Extensão, Lavras, v. 8, n. 58, p. 1-42, 2000.

CARNELOSSI, P. R.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; CRUZ, M. E. S.; ITAKO, A. T.; MESQUINI, R. M. Óleos essenciais no controle pós-colheita de *Colletotrichum gloeosporioides* em mamão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 11, n. 4, p. 399-406, 2009.

CARVALHO-OKANO, R. M.; VIEIRA, M. F. Morfologia externa e taxionomia. In: BUCKNER, C. H.; PICANÇO, M. C (Ed.). **Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2001. p. 33-49.

CASTRO, L. O.; RAMOS, R. L. D. **Principais gramíneas produtoras de óleos essenciais**. Porto Alegre: FEPAGRO, 2003. 31 p. (Boletim FEPAGRO, 11).

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio**. Lavras: ESAL/FAEPE, 1990. 320 p.

CIA, P. **Avaliação de agentes bióticos e abióticos na indução de resistência e no controle pós-colheita da antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) em mamão (*Carica papaya*)**. 2005. 187 f. Tese de Doutorado (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz-ESALQ. Piracicaba, SP, 2005.

COSTA, A. M.; TUPINAMBÁ, D. D. O maracujá e suas propriedades medicinais: estado da arte. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005. p. 475-506.

COSTA, A. S. **Sustentabilidade da produção de Alecrim-Pimenta (*Lippia sidoides* Cham.): micropropagação visando a conservação *in vitro***. 2006. 56 f. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas) - Núcleo de Pesquisa e Pós-Graduação e Estudos em Recursos Naturais. Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, SE, 2006.

CRAVEIRO, A. A.; FERNANDES, A. G.; ANDRADE, C. H. S.; MATOS, F. J. A.; ALENCAR, J. W.; MACHADO, M. I. L. **Óleos essenciais de plantas do Nordeste**. Fortaleza: UFC, 1981. 210 p.

DICKMAN, M. B.; ALVAREZ, A. M. Latent infection of papaya caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. **Plant disease**, Quebec, v. 67, n. 7, p. 748-750, 1983.

DINIZ, L. P.; MAFFIA, L. A.; DHINGRA, O. D.; CASALI, V. W. D.; SANTOS, R. H. S.; MIZUBUTI, E. S. G. Avaliação de produtos alternativos para controle da requeima do tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v.;31, n.;2, p.;171-179, 2006.

DUARTE, M. C. T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **Revista Multiciência**, Revista Interdisciplinar dos Centros e Núcleos da Unicamp. 2006. Disponível em: <http://www.multiciencia.unicamp.br/art05_7.htm>. Acesso em: 15 de maio de 2009.

DURIGAN, J. F. Colheita e conservação pós-colheita. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DO MARACUJAZEIRO, 5., 1998, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal: FUNEP, 1998. p. 257-278.

ENAMORADO, H. E. P. **Crescimento e maturação de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*)**. 1985, 63 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 1985.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. Germoplasma e melhoramento genético do maracujazeiro: desafios da pesquisa. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Ed.) **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005. p. 187-209.

FARIA, T. J.; FERREIRA, R. S.; YASSUMOTO, L.; SOUZA, J. R. P.; ISHIKAWA, N. K.; BARBOSA, A. M. Antifungal activity of essential oil isolated from *Ocimum gratissimum* L. (eugenol chemotype) against phytopathogenic Fungi. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 49, n. 6, p. 867-871, 2006.

FERREIRA, F. R. Recursos genéticos de passiflora. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005. p. 41-52.

FISCHER, I. H.; ARRUDA, M. C.; ALMEIDA, A. M., GARCIA, M. J. M.; JERONIMO, E. M.; PINOTTI, R. N.; BERTANI, R. M. A. Doenças e características físicas e químicas pós-colheita em maracujá amarelo de cultivo convencional e orgânico no centro oeste paulista. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 29, n. 2, p. 254-259, 2007.

FRANCO, A. L. P.; OLIVEIRA, T. B.; FERRI, P. H.; BARA, M. T. F.; PAULA, J. R. Avaliação da composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook) Tronc. (Alfazema), *Ocimum gratissimum* L. (Alfavaca-Cravo) e *Curcuma longa* L. (Açafrão). **Revista Eletrônica de Farmácia**, Goiana, v. 4, n. 2, p. 208-220, 2007.

FRIAS, D. F. R.; KOZUSNY-ANDREANI, D. I. Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica de extratos de plantas e óleo de eucalipto sobre *Trichophyton mentagrophytes*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 11, n. 2, p. 216-220, 2009.

GADELHA, J. C.; INNECCO, R.; ALCANFOR, D.C.; MATTOS, S. H.; FILHO, S. M.; VIEIRA, A. V. Defensivos naturais no tratamento pós-colheita do pedúnculo de melão. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 34, n. 1, p. 5-10, 2003.

GARCIA, A. E.; MOURAD, A. L.; BORDIN, M. R. Embalagem. In: EMBRAPA (Org.). **Maracujá pós-colheita**. Brasília, DF: EMBRAPA Informação Tecnológica, 2002. p. 32-41.

GARCIA, R.; ALVES, E. S. S.; SANTOS, M. P.; VIÉGAS-AQUIJE, G. M. F.; FERNANDES, A. A. R.; SANTOS, R. B.; VENTURA, J. A.; FERNANDES, P. M. B. Antimicrobial activity and potential use of monoterpenes as tropical fruits preservatives. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 39, n. 1, p. 163-168, 2008.

GHINI, R.; KIMATI, H. **Resistência de fungos a fungicidas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. 78 p.

GOMES, L. I. S. **Métodos de inoculação de *Colletotrichum gloeosporioides* e efeito de óleos essenciais no controle da antracnose em frutos de mamoeiro**. 2008. 54 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2008.

GÓES, A. Doenças fúngicas da parte aérea da cultura do maracujá. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DO MARACUJAZEIRO, 5., 1998, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal: FENEP, p. 208-216, 1998.

GUIMARÃES, L. G. L. **Estudo da estabilidade e do efeito fungitóxico do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf)**. 2007. 72 f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2007.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção agrícola/produção agrícola Municipal**. 2010. Disponível em: <http://ibge.gov.br/sevidor_arquivos_est/>. Acesso em: 15 Ago. 2010.

JEFFRIES, P.; DODD, J. C.; JEGER, M. J.; PLUMBLEY, R. A. The biology and control of *Colletotrichum* species on tropical fruit crops. **Plant Pathology**, Londres, v. 39, n. 3, p. 343-366, 1990.

JUNQUEIRA, N. T. V.; SHARMA, R. D.; JUNQUEIRA, K. P.; ANDADRE, L. R. M. Doenças constatadas na fase pós-colheita. In: SANTOS FILHO, H. P., JUNQUEIRA N. T. V. (Ed.). **Maracujá: fitossanidade**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica. 2003. p. 32-36

KIRK, P. M.; CANNON, P. F.; DAVID, J. C.; STAPLERS, J. A. **Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi**. 9 ed. Wallingford, Oxon, UK: CABI, 2001. 655 p.

KISHORE, G. K.; PANDE, S. Evaluation of essential oils and their components for broad-spectrum antifungal activity and control of late leaf spot and crown rot disease in peanut. **Plant Disease**, Quebec, v. 9, n. 4, p. 375-380, 2007.

KLIEBER, A.; SCOTT, E.; WURYATMO, E. Effect of method of application on antifungal efficacy of citral against postharvest spoilage fungi of citrus in culture. **Australasian Plant Pathology**, Orange, v. 31, n. 4, p. 329–332, 2002.

KUMAR, A.; SHUKLA, R.; SINGH, P.; DUBEY, N. K. Biodeterioration of some herbal raw materials by storage fungi and aflatoxin and assessment of *Cymbopogon flexuosus* essential oil and its components as antifungal. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Londres, v. 63, n. 6, p. 712–716, 2009.

LEE, S. L.; CHOI, G. J.; JANG, K. S.; LIM, H. K.; CHO, K. Y.; KIM, J. C. Antifungal activity of five plant essential oils as fumigant against postharvest and soilborne plant pathogenic fungi. **Plant Pathology Journal**, Honolulu, v. 23, n. 2, p. 97-102, 2007.

LIBERATO, J. R. Controle das doenças causadas por fungos, bactérias e nematóides em maracujazeiro. In: ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R.; MONTEIRO, A. J. A.; COSTA, E. (Ed.). **Controle de doenças de plantas frutíferas**. Viçosa: [s.n.], 2002. p. 699-763.

LIMA, A. A. A pesquisa no Brasil com a cultura do maracujá. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DO MARACUJAZEIRO, 4., 1994, Vitória da Conquista, BA. **Anais...** Vitória da Conquista: UESB, 1994. p.16-20.

LIMA, A. A. **Maracujá produção: aspectos técnicos**. Brasília, DF: Embrapa Informações Tecnológicas, 2002. 104 p. (Frutas do Brasil, n. 15).

LIMA FILHO, R. M.; OLIVEIRA, S. M. A.; MENEZES, M. Caracterização enzimática e patogenicidade cruzada de *Colletotrichum* spp. associados a doenças de pós-colheita. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 28, n. 6, p. 620-625, 2003.

LOPEZ, A. M. Q. Taxonomia, patogênese e controle de espécies do gênero *Colletotrichum*. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo-RS, v. 9, p. 291-238, 2001.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2002. 512 p.

MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D. C.; EVANGELISTA, D. J. **Plantas medicinais**. Viçosa: UFV, 2002, 220 p.

MARTINS, J. R.; ALVARENGA, A. A.; CASTRO, E. M.; PINTO, J. E. B. P.; SILVA, A. P. O. Avaliação do crescimento e do teor de óleo essencial em plantas de *Ocimum gratissimum* L. cultivadas sob malhas coloridas. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 10, n. 4, p. 102-107, 2008.

MEDICE, R.; ALVES, E.; ASSIS, R. T.; JÚNIOR, R. G. M; LOPES, E. A. G. L. Óleos essenciais no controle da Ferrugem Asiática da soja *Phakopsora pachyrhizi* Syd, & P.Syd. **Ciência e agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 1, p. 83-90, 2007.

MOLINA, E. B.; JESÚS, E. R.; BAÑOS, B. S.; CALVO, J. R. V.; LÓPEZ, J. M. Inhibitory effect of essential oils against *Colletotrichum gloeosporioides* and *Rhizopus stolonifer* in stored papaya fruit and their possible application in coatings. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 57, n. 2, p. 132–137, 2010.

MONTES–BELMONT, R.; CARVAJAL, M. Control of *Aspergillus flavus* in maize with plant essential oils and their components. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 61, n. 5, p. 616-619, 1998.

MORAES, L. A. S. Óleos essenciais no controle fitossanitário. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Ed.). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 2009. p. 139-152.

MOREIRA, L. M. **Alternativas de controle integrado da podridão parda do pessegueiro**. 2005. 129 f. Tese (Doutorado em produção vegetal) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2005.

MOTTA, W. F. **Conservação pós-colheita do maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) influencia por ceras e filmes plásticos**. 1999. 58 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1999.

NASCIMENTO, A. V. S. **Estudos de isolados brasileiro de Potyvirus causadores de endurecimento dos frutos do maracujazeiro e análise da resistência à doenças de linhagens transgênicas R1 de maracujá-amarelo**. 2006. 70 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2006.

NASCIMENTO, F. R.; CARDOSO, M. G.; SOUZA, P. E.; LIMA, R. K. SALGADO, A. P. S. P.; GUIMARÃES, L. G. L. Efeito do óleo essencial de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC) e do emulsificante Tween® 80 sobre o crescimento micelial de *Alternaria alternata* (Fungi: Hyphomycetes). **Acta Amazônica**, Manaus, v. 38, n. 3, p. 503-508, 2008.

NASCIMENTO, P. F. C.; NASCIMENTO, A. C.; RODRIGUES, C. S.; ANTONIOLLI, A. R.; SANTOS, P. O.; BARBOSA JÚNIOR, A. M.; TRINDADE, R. C. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 17, n. 1, p. 108-113, 2007.

OLIVEIRA, J. A. **Efeito do tratamento fungicida em sementes e no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativus* L.) e pimentão (*Capsicum annuum* L.)**. 1991. 111 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 1991.

OLIVEIRA, R. A. G.; LIMA, E. O.; VIEIRA, W. L.; FREIRE, K. R. L.; TRAJANO, V. N.; LIMA, I. O.; SOUZA, E. L.; TOLEDO, M. S.; SILVA-FILHO, R. N. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 16, n. 1, p. 77-82, 2006.

OLIVEIRA, S. M. A. Infecções quiescentes em *Colletotrichum*: In: WORKSHOP REGIONAL SOBRE COLLETOTRICHUM, 1., 2007. **Palestras**. Recife: UFRPE, 2007. p.1-4.

OLIVEIRA, T. A. S.; OLIVEIRA; S. M. A.; MICHEREFF; S. J.; CÂMARA; M. P. S.; COSTA, V. S. O.; LINS S. R. O. Efeito do estágio de maturação, tipo de inóculo e local de inoculação na severidade da podridão peduncular em manga. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, DF, v. 33, n. 6, p. 409-414, 2008.

ÖZEK, G.; DEMIRCI, F.; OZEK, T.; TABANCA, N.; WEDGE, D.E.; KHAN, S.I.; BASER, K.H.C.; DURAN, D.; HAMZAOGLUE, E. Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of volatiles obtained by four different techniques from *Salvia rosifolia* Sm., and evaluation for biological activity. **Journal of Chromatography A**, New York, v. 1217, n. 5, p. 741-748, 2010.

PATRÍCIO, F. R. A. Controle de doenças de hortaliças: convencional vs. alternativo. **Biológico**, São Paulo, v. 69, n. 2, p. 87-90, 2007.

PEREIRA, A. A.; CARDOSO, M. G.; ABREU, L. R.; MORAIS, A.R.; GUIMARÃES, L. G. L.; SALGADO, A. P. S. P. Caracterização química e efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 3, p. 887-893, 2008.

PEREIRA, A. L.; SILVA, G. S.; RIBEIRO, V. Q. Caracterização fisiológica, cultural e patogênica de diferentes isolados de *Lasiodiplodia theobromae*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 31, n.6, p. 572-578, 2006.

PERES, N. A. R.; KURAME, M. S. C. D.; SOUZA, N. L. Identification and characterization of *Colletotrichum spp.* affecting fruit after harvest in Brazil. **Journal Phytopathology**, Berlin, v. 150, n. 3, p. 128-134, 2002.

PESSOA, W. R. L. S.; OLIVEIRA, S. M. A.; DANTAS, S. A. F.; TAVARES, S. C. C. H.; SANTOS, A. M. G. Efeito da temperatura e período de molhamento sobre o desenvolvimento de lesões de *Colletotrichum musae* em banana. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, n. 2, p. 147-151, 2007.

PIO-RIBEIRO, G.; MARIANO, R. L. R. Doenças do maracujazeiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L. BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. p. 525-534.

PIRES, A. A.; MONNERAT, P. H.; MARCIANO, C. R.; PINHO, L. G. R.; ZAMPIROLI, P. D.; ROSA, R. C. C.; MUNIZ, R. A. Efeito da adubação alternativa do maracujazeiro-amarelo nas características químicas e físicas do solo. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, Viçosa, MG, v. 32, n. 5, p. 1997-2005, 2008.

POZZA, E. A.; SOUZA, P. E.; CASTRO, H. A.; POZZA, A. A. A. Frequência da ocorrência de doenças da parte aérea de plantas na região de Lavras-MG. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 23, n. 4, p. 1001-1005, 1999.

PRUSKY, D. Pathogen quiescence in postharvest diseases. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 34, p. 413-434, 1996.

PRUSKY, D.; LICHTER, A. Activation of quiescent infections by postharvest pathogens during transition from the biotrophic to the necrotrophic stage. **FEMS Microbiological Letters**, Amsterdam, v. 268, n. 1, p. 1-8, 2007.

RAUBER, C. S.; PALMA, E. C.; LIMBERGER, R. P.; APEL, M.; HENRIQUES, A.; SCHA-POVAL, E. E. Avaliação da estabilidade do óleo volátil de *Cymbopogon citratus*. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE LATINO-AMERICANA DE FITOQUÍMICA, 3., 1999; SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE FARMACOBOTÂNICA, 9., 1999, Gramado, RS. **Anais...** Porto Alegre: Metrópole, 1999. 1 CD-ROM.

RIBEIRO JÚNIOR, P. M.; DIAS, M. S. C. Doenças do maracujá. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 26, n. 228, p. 36-39, 2005.

RIBEIRO, L. F.; BEDENDO, I. P. Efeito inibitório de extratos vegetais sobre *Colletotrichum gloeosporioides*: agente causal da podridão de frutos de mamoeiro. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 56, n. 4, p. 1267-1271, 1999.

RODRIGUES, G. S. Agrotóxicos e contaminação ambiental no Brasil. In: CAMPANHOLA, C. BETTIOL, W. (Ed.). **Métodos alternativos de controle fitossanitário**. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente. 2003, p. 217-241.

ROGNIER, T.; COMBRINCK, S.; DUPLOOY, W.; BOTHA, B. Evaluation of *Lippia scaberrima* essential oil and some pure terpenoid constituents as postharvest mycobiocides for avocado fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 57, n. 3, p. 176-182, 2010.

ROGNIER, T.; DUPLOOY, W.; COMBRINCK, S.; BOTHA, B. Fungitoxicity of *Lippia scaberrima* essential oil and selected terpenoid components on two mango postharvest spoilage pathogens. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 48, n. 2, p. 254–258, 2008.

ROZWALKA, L. C.; LIMA, M. L. R. Z. C.; MAY DE MIO, L. L.; NAKASHIMA, T. Extratos, decoctos e óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas na inibição de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides* de frutos de goiaba. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 2, p. 301-307, 2008.

RUGGIERO, C. **Maracujá: do plantio à colheita**. Jaboticabal: FUNEP, 1998, 388 p.

SALGADO, A. P. S. P.; CARDOSO, M. G.; SOUZA, P. E.; SOUZA, J. A.; ABREU, C. M. P.; PINTO, J. E. B. P. Avaliação da atividade fungitóxica de óleos essenciais de folhas de *Eucalyptus* sobre *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* e *Bipolaris sorokiniana*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 2, p. 249-254, 2003.

SALOMÃO, L. C. C. Colheita. In: SANTOS FILHO, H. P., JUNQUEIRA, N. T. V. (Ed.) **Maracujá: fitossanidade**. Brasília, DF: Embrapa informação tecnológica, 2003, p. 16-19.

SALOMÃO, L. C. C.; VIEIRA, G.; MOTA, W. F. Tecnologia de colheita e pós-colheita. In: BUCKNER, C. H.; PICANÇO, M. C. (Ed.) **Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2001. p. 283-303.

SALUSTIANO, M. E.; FILHO, A. C. F.; POZZA, E. A.; CASTRO, H. A. Extratos de candeia (*Eremanthus erythropappus* (dc.) macleish) na inibição *in vitro* de *cylindrocladium scoparium* e de quatro espécies de ferrugens. **Cerne**, Lavras, v. 12, n. 2, p. 189-193, 2006.

SANTOS FILHO, H. P.; JUNQUEIRA, N. T. V. (Ed.). **Maracujá: fitossanidade**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2003, 86 p.

SENHOR, R. F.; CÂMARA, M. P. S.; PRICHOA, L. F.; LIMA, M. B.; SALES JUNIOR, R.; MICHEREFF, S. J. Influência do método de inoculação, intensidade do fermento e idade do fruto na severidade da podridão-de-cratera em melão. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 34, n. 3, p. 232-237, 2008.

SENHOR, R. F.; SOUZA, P. A.; NETO, R. C. A.; MARACAJÁ, F. J. Manejo de doenças pós-colheita. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável Grupo Verde de Agricultura Alternativa (GVAA)**, Mossoró, v. 4, n. 1, p. 00-13, 2009.

SHUKLA, R.; KUMAR, A.; SINGH, P.; DUBEY, N. K. Efficacy of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown essential oil and its monoterpene aldehyde constituents against fungi isolated from some edible legume seeds and aflatoxin B1 production. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 135, n. 2, p. 165–170, 2009.

SILVA, A. C. **Óleos essenciais para o controle de “*Colletotrichum truncatum*” e ferrugem asiática em soja**. 2009. 67 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2009.

SILVA, A. C.; SALES, N. L. P.; ARAÚJO, A. V.; CALDEIRA JÚNIOR, C. F. Efeito *in vitro* de compostos de plantas sobre o fungo *Colletotrichum gloeosporioides*: isolado do maracujazeiro. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n.esp., p. 1853-1860, 2009.

SILVA, K. S. **Avaliação da agressividade de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) em manga, mamão, maracujá e goiaba na pós-colheita**. 2005. 50 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Vitória da Conquista, BA, 2005.

SILVA, K. S.; REBOUÇAS, T. N. H.; LEMOS, O. L.; BOMFIM, M. P.; BOMFIM, A. A.; ESQUIVEL, G. L.; BARRETO, A. P. P.; SÃO JOSÉ, A. R.; DIAS, N. O.; TAVARES, G. Patogenicidade causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) em diferentes espécies frutíferas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.;28, n.;1, p.;131-133, 2006.

SILVA, L. L.; HELDWEIN, C. G.; REETZ, L. G. B.; HÖRNER, R.; MALLMANN, C. A.; HEINZMANN, B. M. Composição química, atividade antibacteriana *in vitro* e toxicidade em *Artemia salina* do óleo essencial das inflorescências de *Ocimum gratissimum* L., Lamiaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v.;20, n.;5, p. 700-705, 2010.

SILVA, M. G. V.; CRAVEIRO, A. A.; MATOS, F. J. A.; MACHADO, M. I. L.; ALENCAR, J. W. Chemical variation during daytime of constituents of the essential oil of *Ocimum gratissimum* leaves. **Fitoterapia**, New Delhi, v. 70, n. 1, p. 32-34, 1999.

SILVA-SANTOS, A.; BIZZO, H. R.; ANTUNES, A. M. S.; D'AVILA, L. A. A proteção patentária na utilização de óleos essenciais e compostos terpênicos para o desenvolvimento tecnológico e industrial. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, n. 4, p. 9-13, 2006.

SILVÉRIO, F. O.; BARBOSA, L. C.; MALTHA, C. R.; FIDÊNCIO, P. H.; CRUZ, M. P.; VELOSO, D. P.; MILANEZ, A. F. Effect of storage time on the composition and content of wood extractives in *eucalyptus* cultivated in Brazil. **Bioresource Technology**, Barking, v. 99, n. 11, p. 4878-4886, 2008.

SODAEIZADEH, H.; RAFIEIOLHOSSAIN, M.; VAN DAMM, P. Herbicidal activity of a medicinal plant, *Peganum harmala* L., and decomposition dynamics of its phytotoxins in the soil. **Industrial Crops and Products**, v. 31, n. 2, p. 385–394, 2010.

SOUJA JÚNIOR, I. T.; SALES, N. L. P.; MARTINS, E. M. Efeito fungitóxico de óleos essenciais sobre *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado do maracujazeiro amarelo. **Biotemas**, Florianópolis, v. 22, n. 3, p.77-83, 2009.

SVIRCEV, A. M.; SMITH, R. J.; ZHOU, T.; HERNADEZ, M.; LIU, W.; CHU, C. L. Effects of thymol fumigation on survival and ultrastructure of *Monilinia fruticola*. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 45, n. 2, p. 228–233, 2007.

STADNIK, M. J.; TALAMINI, V. Extratos vegetais e de algas no controle de doenças de plantas. In: STADNIK, M. J.; TALAMINI, V. **Manejo ecológico de doenças de plantas**. Florianópolis, SC: CCA/UFSC, 2004, p. 45-62.

STANGARLIN, J. R.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; CRUZ, M. E. S.; NOZAKI, M. H. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, DF, v. 11, n. 2, p. 16-21, 1999.

TAVARES, G. M. **Controle químico e hidrotérmico da antracnose em frutos de mamoeiro (*Carica papaya* L.) na pós-colheita**. 2004. 55 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2004.

TAVARES, G. M.; SOUZA, P. E. Efeito de fungicidas no controle *in vitro* de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente etiológico da antracnose do mamoeiro (*Carica papaya* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 1, p. 52-59, 2005.

VALERO, D.; VALVERDE, J. M.; MARTÍNEZ-ROMERO, D.; GUILLÉM, F.; CASTILLO, S.; SERRANO, M. The combination of modified atmosphere packaging with eugenol or thymol to maintain quality, safety and functional properties of table grapes. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam v. 41, n. 3, p. 317–327, 2006.

VIANA, F. M. P.; FREIRE, F. C. O.; CARDOSO, E. C.; VIDAL, J. C. **Principais doenças do maracujazeiro na região nordeste e seu controle**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2003. 12 p. (Comunicado Técnico, 86).

WHEELER, W. B. The role of research and regulation in 50 years of pest management in agriculture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Easton, Pa., US, v. 50, n. 15, p. 4151-4155, 2002.

WILSON, C. L.; SOLAR, J. M.; GHAOUTH, A. E.; WISNIEWSKI, M. E. Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. **Plant Disease**, Quebec, v. 81, n. 2, p. 204-210, 1997.

ZACARONI, L. M.; CARDOSO, M. G.; SOUZA, P. E.; PIMENTEL, F. A.; GUIMARÃES, L. G. L.; SALGADO, A. P. S. P. Potencial fungitóxico do óleo essencial de *Piper hispidinervum* (pimenta longa) sobre os fungos fitopatogênicos *Bipolaris sorokiniana*, *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum gloeosporioides*. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 39, n. 1, p. 193-198, 2009.