



MARIA GILMARA DE OLIVEIRA SOARES

**PADRONIZAÇÃO DA INOCULAÇÃO E
CONTROLE DA ANTRACNOSE EM
BANANAS COM PELÍCULA À BASE DE
FÉCULA DE MANDIOCA E ÓLEOS
ESSENCIAIS**

LAVRAS - MG

2016

MARIA GILMARA DE OLIVEIRA SOARES

**PADRONIZAÇÃO DA INOCULAÇÃO E CONTROLE DA
ANTRACNOSE EM BANANAS COM PELÍCULA À BASE DE FÉCULA
DE MANDIOCA E ÓLEOS ESSENCIAIS**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Lavras, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em
Agronomia/Fitopatologia, área de
concentração em Fitopatologia, para a
obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Eduardo Alves

LAVRAS - MG

2016

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha
Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados
informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Soares, Maria Gilmara de Oliveira.

Padronização da inoculação e controle da antracnose em bananas com película à base de fécula de mandioca e óleos essenciais / Maria Gilmara de Oliveira Soares. – Lavras: UFLA, 2016.

99 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2016.

Orientador(a): Eduardo Alves.

Bibliografia.

1. *Musa* spp. 2. Doença pós-colheita. 3. Controle alternativo. 4. Microscopia. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

MARIA GILMARA DE OLIVEIRA SOARES

**PADRONIZAÇÃO DA INOCULAÇÃO E CONTROLE DA
ANTRACNOSE EM BANANAS COM PELÍCULA À BASE DE FÉCULA
DE MANDIOCA E ÓLEOS ESSENCIAIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 10 de março de 2016.

Dr. Rafael Pio UFLA

Dr. Ângelo Albérico Alvarenga EPAMIG

Dr. Eduardo Alves

Orientador

LAVRAS - MG

2016

A 'Deus' por todas as graças concedidas em minha vida.

DEDICO.

Ao meu amável esposo, Aurivan Soares, por estar sempre presente, em todos os momentos da minha vida, dando-me incentivo e apoio.

Aos meus amáveis pais, Maria Solange e Geraldo.

Aos meus queridos irmãos, Geórgia e Jaires.

Ao meu sobrinho querido Gustavo Ryan.

OFEREÇO.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, por suprir todas as minhas necessidades e ser meu guia e fortaleza durante todos os passos dados nesta caminhada.

À Universidade Federal de Campina Grande, por ter - me proporcionado a oportunidade de fazer o curso de Agronomia.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade de realizar o mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor Eduardo Alves, pela orientação, amizade e ensinamentos.

A todos os professores do Departamento de Fitopatologia da UFLA, pelos ensinamentos valiosos.

Aos professores Rafael Pio e Ângelo Albérico Alvarenga, pela participação na banca e pelas excelentes contribuições no trabalho.

A todos os funcionários da UFLA, pelos serviços prestados.

A todos os colegas do DFP, especialmente, aos colegas de turma.

Às técnicas do LME, Aline e Elisa, pelos serviços prestados e amizade.

Aos colegas Fabiano e Aline, pelo auxílio no trabalho.

A todos os colegas do LME, pela amizade e momentos de descontração.

As colegas do Departamento de Química, Thaís e Karen, e as técnicas Priscila e Lidiany, pelo auxílio nas análises químicas dos óleos essenciais.

À Mestre Cláudia, à Doutora Sarah e ao professor Ludwig pelo auxílio e apoio na identificação molecular do isolado.

Aos meus vizinhos de Lavras, Mauro “*in memoriam*,” Elza, Fernanda e Maurinho, pela amizade.

Aos meus queridos pais, Maria Solange e Geraldo, pelos primeiros ensinamentos, amor e incentivo.

Aos meus irmãos, Geórgia e Jaires, pelo carinho e fiel amizade.

A minha sogra, Lúcia, pela amizade e carinho.

Ao meu amor, Aurivan Soares, pela ajuda no trabalho, paciência, sinceridade e companheirismo em todos os momentos.

A todos que, direta e indiretamente, contribuíram para a consolidação deste sonho.

Muito obrigada!

RESUMO GERAL

A banana é uma das frutas mais produzidas no mundo inteiro. Dentre os fatores limitantes do cultivo, destacam-se as doenças pós-colheita, como a antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum musae*. Em razão da importância de conhecer os fatores responsáveis pelo desenvolvimento da antracnose e o seu controle com uso de produtos naturais, objetivou-se, com este trabalho, avaliar diferentes métodos de inoculação e períodos de molhamento no desenvolvimento de lesões de *Colletotrichum musae* em bananas, bem como verificar o potencial *in vitro* e *in vivo* de película à base de fécula de mandioca e óleos essenciais no controle da antracnose. O isolado de banana foi identificado, por meio de caracteres morfológicos e moleculares, utilizando-se as regiões gênicas GAPDH e ACT. Foram utilizados cinco métodos de inoculação, um furo com micélio (1 FM), um furo com suspensão (1FS), cinco furos com micélio (5FM), cinco furos com suspensão (5FS) e corte com suspensão (CS), combinados com cinco períodos de molhamento (0, 6, 12, 24 e 48 h). Os óleos essenciais de cravo-da-índia, capim-limão, tomilho, canela e orégano foram escolhidos, mediante potencial de inibição do patógeno e utilizados na concentração 0,1% selecionada em ensaio preliminar. *In vitro* foram realizados dois experimentos, um para verificar o crescimento micelial e outro para avaliar a germinação de conídios de *C. musae*. *In vivo* bananas foram tratadas de duas formas, uma curativa e outra preventiva, com película de fécula de mandioca nas concentrações 2 e 3% e óleos essenciais combinados ou não, visando o controle da antracnose. Amostras de fragmentos da casca lesionada das frutas foram coletadas para análise em microscópio eletrônico de varredura (MEV). O isolado apresentou características morfológicas de *C. musae*. As análises filogenéticas agruparam o isolado no complexo 'gloeosporioides' e no mesmo clado da espécie *C. musae*. Verificou-se maior desenvolvimento de lesões com o método de inoculação 5FS combinado com 48 h de molhamento. *In vitro* o óleo essencial de orégano a 0,1% inibiu totalmente o crescimento micelial e a germinação de *C. musae*. Nos experimentos *in vivo* curativo e preventivo, as películas 2 e 3%, os óleos essenciais de capim-limão e tomilho isolados e os mesmos combinados com as películas reduziram os tamanhos das lesões em bananas. As imagens obtidas por MEV registraram a ação promovida pelas películas 2 e 3% e óleos essenciais sobre a ultraestrutura do patógeno. Desta forma, esses produtos alternativos podem ser indicados como estratégias promissoras no controle da antracnose em bananas.

Palavras-chave: *Musa* spp.. Doença pós-colheita. Controle alternativo. Microscopia.

GENERAL ABSTRACT

The banana is one of the most-produced fruits worldwide. Among the limiting factors of its cultivation, are post-harvest diseases, such as the anthracnose caused by *Colletotrichum musae*. Given the importance of knowing the factors responsible for the anthracnose development and how to control it with natural products, we aimed in this study to evaluate different inoculation methods and wet periods in the development of *Colletotrichum musae* lesions in bananas, as well as to check the *in vitro* and *in vivo* potential control of anthracnose by a film of cassava starch and essential oils. The banana fungal strain was identified by morphological and molecular characters, using genomic regions GAPDH and ACT. Five inoculation methods were used, one hole with mycelium (1 HM), one hole with suspension (1HS), five holes with mycelium (5HM), five holes with suspension (5HS) and cut with suspension (CS), combined with five wetting periods (0, 6, 12, 24, and 48 h). The essential oils of clove, lemon grass, thyme, cinnamon, and oregano were chosen for their potential inhibition of pathogens and were used at 0.1% concentration, selected in a preliminary test. Two experiments were performed *in vitro*, one to check the mycelial growth and the other to assess the *C. musae* conidial germination. During the *in vivo* test, bananas were treated by curative and preventive methods with cassava starch film at 2 and 3% concentrations and with essential oils combined or not, aiming to control the anthracnose. Fragmented samples of damaged fruit skins were collected for analysis in a scanning electron microscope (SEM). The strain showed morphological features of *C. musae*. The phylogenetic analysis grouped the strain in the 'gloeosporioides' complex and in the same clade of *C. musae*. A higher development of lesions with the 5FS inoculation method combined with 48 h of wetness. Regarding the *in vitro* test, the oregano essential oil at 0.1% completely inhibited the mycelial growth and germination of *C. musae*. For the curative and preventive *in vivo* test, films at 2 and 3%, lemon grass essential oil, as well as thyme alone or all combined with films reduced the lesion sizes in bananas. The images from SEM showed the effect of films at 2 and 3% and of essential oils on the pathogen ultrastructure. Thus, these alternative products can be indicated as promising strategies for anthracnose control in bananas.

Keywords: *Musa* spp.. Post-harvest disease. Alternative control. Microscopy.

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1 Introdução Geral.....	11
1	INTRODUÇÃO.....	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
2.1	O cultivo da bananeira.....	13
2.2	Principais doenças do cultivo da bananeira.....	14
2.3	Antracnose em banana.....	15
2.3.1	Fatores que influenciam o desenvolvimento da antracnose.....	17
2.3.2	Métodos de controle para antracnose em banana.....	18
2.4	Óleos essenciais.....	20
2.5	Películas biodegradáveis.....	21
2.6	Aplicações da Microscopia no estudo de doenças.....	22
	REFERÊNCIAS.....	24
	CAPÍTULO 2 Métodos de inoculação e períodos de molhamento no desenvolvimento de lesões causadas por <i>Colletotrichum musae</i> em bananas.....	30
1	INTRODUÇÃO.....	32
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	34
2.1	Obtenção do isolado incorporação a coleção micológica e caracterização morfológica e molecular.....	34
2.2	Teste de patogenicidade.....	37
2.3	Influência de métodos de inoculação e períodos de molhamento no desenvolvimento de lesões ocasionadas por <i>Colletotrichum musae</i> em bananas.....	38
2.4	Análise dos dados.....	39
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
3.1	Caracterização morfológica e molecular do isolado de banana.....	40
3.2	Teste de patogenicidade.....	42
3.3	Influência dos métodos de inoculação no desenvolvimento das lesões.....	43
3.4	Influência dos períodos de molhamento no desenvolvimento das lesões.....	46
4	CONCLUSÕES.....	49
	REFERÊNCIAS.....	50
	CAPÍTULO 3 Película à base de fécula de mandioca e óleos essenciais no controle da antracnose em bananas.....	53
1	INTRODUÇÃO.....	55
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	57
2.1	Seleção, obtenção e concentração dos óleos essenciais.....	57
2.2	Composição química dos óleos essenciais.....	59

2.3	Aquisição da fécula de mandioca e do fungicida	60
2.4	Tratamentos <i>in vitro</i>	60
2.5	Avaliação <i>in vitro</i> de película à base de fécula de mandioca e óleos essenciais na inibição do crescimento micelial e germinação de conídios de <i>Colletotrichum musae</i>	61
3	Experimento <i>in vivo</i> preventivo e curativo	64
3.1	Aquisição e preparo das frutas	64
3.2	Preparo do inóculo e inoculação das frutas	64
3.3	Tratamentos curativos e preventivos.....	65
3.4	Preparo das soluções para o revestimento das frutas	66
3.5	Recobrimento das frutas tratadas de forma curativa e preventiva.....	67
3.6	Delineamento experimental e avaliações.....	67
3.7	Coletas e preparo das amostras provenientes de bananas para microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	68
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
4.1	Seleção da concentração e composição química dos óleos essenciais	69
4.2	Avaliação <i>in vitro</i> de película à base de fécula mandioca e óleos essenciais na inibição do crescimento micelial e germinação de conídios de <i>Colletotrichum musae</i>	75
4.3	Experimento <i>in vivo</i> curativo	79
4.4	Experimento <i>in vivo</i> preventivo	86
5	CONCLUSÕES	94
	REFERÊNCIAS	95

CAPÍTULO 1

Introdução Geral

1 INTRODUÇÃO

A fruticultura representa um amplo segmento da agricultura brasileira. Possui alto efeito multiplicador de emprego e renda, além de participar de maneira direta na economia do país, em função das exportações e do mercado interno. Atualmente, o Brasil tem se destacado na produção de frutas tropicais, já que durante todo ano dispõe de condições climáticas adequadas para o cultivo, especialmente, na região Nordeste (FACHINELLO et al., 2011). De acordo com dados da Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO (2016), a produção mundial de frutas tropicais em 2013 foi cerca de 199 milhões de toneladas. Entre as principais frutíferas tropicais mais consumidas no Brasil e no mundo destaca-se a banana (*Musa spp.*) (ANUÁRIO..., 2016).

A produção brasileira de bananas em 2015 foi de cerca de sete milhões de toneladas, e os estados maiores produtores foram São Paulo (1,15 milhão de toneladas); Bahia (995 mil toneladas); Minas Gerais (796 mil toneladas); Santa Catarina (710 mil toneladas) e Pará (586 mil toneladas) (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2016). Entre os fatores preocupantes do cultivo, destacam-se as doenças pós-colheita, responsáveis por grandes perdas no agronegócio da fruta. A mais significativa é a antracnose, causada pelo agente etiológico *Colletotrichum musae*. Esse patógeno se manifesta de forma quiescente no hospedeiro, e os sintomas da doença só aparecem após o amadurecimento das frutas, podendo causar grandes transtornos aos atacadistas, varejistas e, sobretudo, aos importadores de frutas (SOMMER, 1982).

O desenvolvimento da antracnose é influenciado por diversos fatores ambientais favoráveis, tais como temperatura em torno de 25-30 °C e alta umidade relativa. Além disso, a inoculação do patógeno no hospedeiro, também, contribui para o início da infecção. Os métodos de inoculação mais utilizados nesse patossistema são por via aplicação e pulverização de suspensão, contendo estruturas do patógeno e discos de micélio, aplicados no local a ser inoculado. Esses métodos usados na presença de ferimentos contribuem para a penetração do patógeno de maneira mais rápida (DENARDI; BERTON; SPENGLER, 2003). Ferimentos em frutos aumentam a atividade metabólica celular, provoca elevação na taxa de respiração e na síntese de etileno, resultando na deterioração acelerada dos frutos (DURIGAN; MATTIUZ; DURIGAN, 2005).

A utilização de fungicidas tem sido o principal método de controle da antracnose. Entretanto, o controle químico apresenta várias limitações, principalmente, com relação ao acúmulo de resíduos nos frutos devido ao uso excessivo, e ao surgimento de patógenos resistentes (BASTOS; ALBUQUERQUE, 2004). Métodos alternativos de controle, com o uso de produtos orgânicos naturais como óleos essenciais e películas biodegradáveis, têm-se destacado na pós-colheita de frutos, aumentando a vida útil e tornando-os mais atrativos ao consumidor. Diversos trabalhos já evidenciaram a utilização desses produtos no controle de doenças (DUAMKHAMANEE, 2008; LIMA et al., 2012; MAQBOOL et al., 2011; PEREIRA et al., 2006, 2011).

Considerando a importância dos fatores que influenciam o desenvolvimento da antracnose e a necessidade da redução no uso de produtos químicos, com a implantação de métodos alternativos de controle, este trabalho foi realizado com os objetivos de avaliar diferentes métodos de inoculação e períodos de molhamento no desenvolvimento de lesões do fungo *Colletotrichum musae* em bananas e verificar o potencial *in vitro* e *in vivo* de película à base de fécula de mandioca e óleos essenciais no controle da antracnose.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O cultivo da bananeira

A bananeira é uma das frutíferas mais populares do mundo, tanto em relação aos requisitos destinados à produção quanto à comercialização. Pode ser utilizada de diversas formas verde, madura, crua ou processada, constituindo uma importante fonte de renda para muitos brasileiros (FIORAVANÇO, 2003).

A banana é uma fruta com alto teor de carboidratos, vitaminas e nutrientes. É altamente perecível em temperatura ambiente, sendo que, em qualquer estágio de maturação necessita de cuidados especiais por ser suscetível a danos mecânicos, além disso, as injúrias podem servir como porta de entrada para diversos patógenos (MORAES et al., 2005).

A bananeira é uma planta monocotiledônea, herbácea, oriunda do sudoeste da Ásia, pertencente à ordem Scitaminales, família Musaceae, subfamília Musoideae, gênero *Musa*, abrangendo entre 24 e 30 espécies, das quais se originam todas as cultivares produtoras de frutos partenocárpicos comestíveis (CRONQUIST, 1981).

Segundo Borges e Souza (2004), o cultivo da bananeira se adapta a diversos tipos de solos de preferência planos, profundos e com bom nível de aeração e drenagem. Exige temperaturas altas e uniformes, em torno de 28 °C, precipitação anual de 1.900 mm, alta luminosidade, ventos leves, umidade relativa anual superior a 80% e altitudes que variam de zero a 1.000 m acima do nível do mar.

No Brasil, as cultivares mais difundidas são ‘Prata’, ‘Pacovan’, ‘Prata-Anã’, ‘Maçã’, ‘Mysore’, ‘Terra’, ‘D’Angola’ do grupo AAB, ‘Nanica’, ‘Nanicão’ e ‘Grande Naine’ pertencente ao grupo AAA (SILVA et al., 2004). De acordo com esses autores, a banana ‘Prata’ foi inserida no Brasil pelo

incentivo dos portugueses e seus frutos apresentam angulosidade definida, com sabor ligeiramente ácido e a polpa de textura consistente proporciona boa aceitação por maior parte dos consumidores.

2.2 Principais doenças do cultivo da bananeira

Na cadeia produtiva da bananeira, as doenças constituem uma das maiores limitações, pois existem vários agentes patogênicos que afetam sua produção, entre eles os fungos constituem o principal grupo de fitopatógenos, tanto pelo número de espécies que afetam o cultivo, quanto pelas perdas causadas, tornando-se, em alguns casos, fator limitante para o cultivo de algumas variedades (CORDEIRO; MATOS; MEISSNER FILHO, 2004).

Entre as principais doenças da bananeira, destaca-se a Sigatoka-amarela, cujo agente etiológico é o fungo *Mycosphaerella musicola*. Essa doença apresenta distribuição endêmica no país, causando perdas que reduzem, em média, 50% da produção (CORDEIRO; MATOS; MEISSNER FILHO, 2004). Já, a Sigatoka-negra, cujo agente etiológico é o fungo *Mycosphaerella fijiensis*, provoca perdas de até 100% nas cultivares suscetíveis, como a ‘Nanica’, ‘Nanicão’, ‘Prata’ e ‘Maçã’ (FERRARI et al., 2005). Por outro lado, o mal-do-Panamá, causado pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense* é a doença vascular da bananeira mais destrutiva, nas regiões tropicais do mundo, onde se cultiva bananeira que, na maioria dos casos, são suscetíveis à doença (PEREIRA et al., 2005).

Almeida e Silva (2008) afirmaram que doenças pós-colheita ocasionam perdas ditas como o principal agravante da bananicultura, atingindo volumes expressivos. Esses autores constataram perdas de 3,25, 1,66 e 2,1%, em propriedades rurais, no mercado livre do produtor e no segmento varejista, respectivamente.

2.3 Antracnose em banana

A antracnose tem como agente etiológico o fungo *Colletotrichum musae* e ocorre, principalmente, na fase de maturação das frutas. Os esporos liberados dos acérvulos se depositam sobre as frutas ainda verdes no campo, germinam e nelas penetram, permanecendo a infecção latente até o início da maturação (COSTA; ERABADUPITIYA, 2005).

As duas formas distintas dessa doença são a antracnose latente, originária da infecção quiescente e que permanece dormente até o início da maturação, e a antracnose não latente, produzida pela invasão do patógeno, principalmente, por intermédio das injúrias ocasionadas nas frutas verdes transportados de forma inadequada (CORDEIRO; MATOS; MEISSNER FILHO, 2004).

O gênero *Colletotrichum* pertence ao filo Ascomycota, é amplamente variável para determinadas características, como caracteres morfológicos entre eles coloração da colônia, tamanhos e forma de conídios, além da patogenicidade, que já foi evidenciada em diversos patossistemas (SERRA et al., 2011). Apresenta ampla distribuição geográfica causando, principalmente, doenças pós-colheita em frutas como: *Musa* spp. (banana) e frutos como: *Persea americana* (abacate), *Mangifera indica* (manga), *Passiflora edulis* (maracujá) e *Carica papaya* (mamão) (PERES et al., 2002).

A correta identificação de espécie de *Colletotrichum*, responsável por causar antracnose em frutíferas, é considerada é uma etapa fundamental para o entendimento do ciclo de vida do patógeno, além de contribuir para corretas adoções de medidas de controle visando reduzir as perdas pós-colheita (SERRA et al., 2011). Essa etapa é dificultada, em função da utilização de poucos caracteres, sendo que na maioria das situações apenas caracteres morfológicos não são suficientes para definir e delimitar espécies, o que revela a importância

de adoção de caracteres moleculares como a filogenia a qual estuda o grau de parentesco das espécies (MENEZES, 2006). Estudos filogenéticos multigenes, para espécies de *Colletotrichum*, têm sido alvo de pesquisa, em diversos trabalhos, já que análises filogenéticas favorecem informações confiáveis para identificação de determinada espécie e permite o entendimento de relações evolutivas entre espécies.

A antracnose é caracterizada pela formação de lesões deprimidas, escuras, as quais coalescem com o avanço da doença. Sob condições de alta umidade, cobrem-se de frutificação rosadas. Geralmente, as lesões são superficiais, mas podem, em casos severos, com o amadurecimento da fruta, atingir a polpa (CORDEIRO; MATOS; KIMATI, 2005). As frutas infectadas pelo fungo *C. musae* têm o amadurecimento mais acelerado e, mesmo que a polpa não seja atingida, a fruta torna-se de aspecto impróprio para o consumo, inviabilizando a exportação, transporte, embalagem e comercialização (OLIVEIRA et al., 2013).

A sobrevivência do fungo ocorre, geralmente, nos restos vegetais das plantas, como pecíolos, folhas velhas e nos vestígios florais dos cachos e brácteas. Os conídios são disseminados pelos respingos da água da chuva ou da irrigação por aspersão e pelo vento para as flores e frutas novas e permanecem latentes até a maturação das frutas (CORDEIRO; MATOS; KIMATI, 2005). A temperatura ideal para o crescimento e a esporulação do fungo é de 25 a 30 °C. Em presença de água livre, os conídios germinam entre 4-24 h, formam apressório dentro de 4 horas e a penetração ocorre entre 24 a 72 horas. Conídios hialinos, unicelulares e cilíndricos são produzidos em acérvulos e estão envolvidos por uma matriz gelatinosa composta de polissacarídeo e proteínas solúveis em água na qual os protegem de alterações extremas de umidade e temperatura e os mantém viáveis por longos períodos (MENEZES, 2006).

Devido à ampla variabilidade encontrada em espécies de *Colletotrichum*, é de fundamental importância o conhecimento dos fatores que ocasionam variabilidade, pois o fungo pode quebrar a resistência do hospedeiro deixando-o susceptível, sendo necessária a implantação de métodos mais eficientes no controle da antracnose (SERRA et al., 2011).

2.3.1 Fatores que influenciam o desenvolvimento da antracnose

As doenças pós-colheita são influenciadas, significativamente, por um ambiente favorável, patógeno agressivo e hospedeiro susceptível. Além disso, essas doenças apresentam frequência e intensidade proporcional entre a colheita e o consumo, sua ocorrência é favorecida diretamente pelas condições ambientais prevalentes nesse período (AWAD, 1993). Entre as variáveis ambientais que mais afetam o início e o progresso de doenças destaca-se a temperatura e a umidade. A temperatura pode influenciar na germinação e no número de esporos de alguns fungos, e a umidade é imprescindível para emissão de tubo germinativo e penetração no hospedeiro, além de provocar alterações na incidência e severidade, favorecendo a multiplicação de micro-organismos (AGRIOS, 2005).

A temperatura está relacionada às atividades do fitopatógeno. É, de maneira geral, seu efeito é menos intenso que aquele exercido pela umidade relativa, pois, em uma região particular, a ocorrência de muitas doenças está correlacionada com a abundância e distribuição de chuvas durante o ano. Em regiões tropicais e subtropicais os patógenos podem crescer em uma faixa de temperatura maior do que a umidade. O fungo *C. musae* se enquadra bem nesse contexto, em função da bananeira se adaptar bem às condições climáticas encontradas nessas regiões. A temperatura e umidade ideais, para ocorrência da antracnose, é em torno de 25-30 °C e 90 ± 5%, respectivamente. No entanto, a

redução da intensidade e frequência dos fatores ambientais inviabilizam o desenvolvimento da doença (AGRIOS, 2005). Vários estudos já relataram a influência da temperatura e umidade no progresso de doenças (OLIVEIRA et al., 2014; SOARES; LOURENÇO; AMORIM, 2008).

Na interação planta-patógeno, o hospedeiro desempenha um importante papel tanto na falha quanto no sucesso da infecção pelo patógeno, fazendo-se necessário encontrar o método de inoculação mais adequado, prático e seguro para cada patossistema (SENHOR et al., 2008). A inoculação contribui para o início da infecção e influencia a penetração do patógeno. Para o patossistema banana x *C. musae*, os métodos de inoculação mais usados são através da aplicação ou pulverização de suspensão, contendo conídios do patógeno e discos de micélio, contendo estruturas do patógeno, deixados sobre o local a ser inoculado. A maioria dos fungos fitopatogênicos penetra nos tecidos do hospedeiro, de forma direta na cutícula intacta, por aberturas naturais, principalmente, nos estômatos e por ferimentos. Frutos inoculados através de ferimentos permitem uma rápida invasão do patógeno, e conseqüentemente, o estabelecimento da doença (DENARDI; BERTON; SPENGLER, 2003).

A quantidade e especificidade dos ferimentos podem causar maiores lesões, isso já foi evidenciado em frutos de goiaba e melão por diversos autores (OLIVEIRA et al., 2014; SENHOR et al., 2008). Assim, estudos nesse sentido, para esse patossistema, são necessários para melhorar explicar a epidemiologia da doença e reduzir as frequentes perdas pós-colheita.

2.3.2 Métodos de controle para antracnose em banana

As medidas de controle para antracnose devem ser iniciadas no campo, pois o patógeno na maioria das vezes permanece quiescente nas frutas verdes iniciando o processo infeccioso durante a maturação da fruta (CHILLET et al.,

2006). Assim, uma das principais medidas de controle para essa doença é a utilização de variedades resistentes associadas com outras características de interesse agrônomo, como as boas práticas de manejo cultural na eliminação de restos florais e no despencamento, lavagem e embalagem cuidadosa das frutas com medidas rígidas de assepsia (CORDEIRO; MATOS; KIMATI, 2005; CORDEIRO; MATOS; MEISSNER FILHO, 2004). Segundo Ventura, Costa e Tatagiba (2003), o tratamento pós-colheita dos frutos é uma forma de controlar o micélio quiescente e protegê-lo de infecções secundárias ocorridas durante o armazenamento e transporte para os mercados consumidores.

A maioria dos grandes produtores, normalmente, inclui o uso de produtos químicos, os quais aumentam o custo da produção e torna inviável a adoção dessa prática pelos agricultores orgânicos (SILVA et al., 2009). Embora o seu uso seja eficaz, o agrotóxico tem sido considerado um problema, visto que pode afetar o processo de amadurecimento natural das frutas, reduzindo a eficácia do controle químico e levar ao aparecimento de fungos resistentes devido ao seu uso permanente (GAMAGAE et al., 2003). Além disso, a aplicação e dosagens incorretas acarretam risco aos humanos e ao meio ambiente.

Com o atual conhecimento sobre os impactos ambientais, problemas relacionados à intoxicação do homem e resistência de fitopatógenos, as pesquisas têm buscado produtos alternativos de baixo custo e inofensivos ao homem e ao ambiente (STADNIK; RIVERA, 2001). A utilização dos compostos naturais de origem vegetal como óleos essenciais, obtidos a partir de flores, folhas, frutos, sementes, gramíneas, raízes, rizomas e caules de plantas medicinais da flora nativa, tem indicado seus potenciais no controle de fitopatógenos, tanto por ação fungitóxica direta, inibindo o crescimento micelial e a germinação de esporos, quanto pela capacidade de induzir o acúmulo de fitoalexinas (SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN; CRUZ, 2003).

Outro composto natural é a fécula de mandioca, produto à base de amido extraído da raiz de mandioca na forma de pó branco, inodoro e sem sabor, utilizado como ingrediente de uma série de produtos em diversas áreas da atividade industrial, além disso apresenta boas características para formação de películas comestíveis aplicadas na conservação pós-colheita de frutos (WOGGUM; SIRIVONGPAISAL; WITTAYA, 2014). A combinação de óleos essenciais com esse tipo de película biodegradável representa alvo de pesquisa e estratégia promissora no controle de doenças pós-colheita de diversas frutíferas.

2.4 Óleos essenciais

Os óleos essenciais são constituintes orgânicos e voláteis, normalmente, formados em células especiais ou grupos de células encontrados em muitas folhas, sementes, gramas, raízes, rizomas e caules de plantas. Apresentam aspecto oleoso e tem como principal característica a volatilidade a qual os diferencia dos óleos fixos. São aplicados como aromas e fixadores de fragrâncias em composições farmacêuticas, fornecendo compostos purificados como limoneno, citral, timol, carvacrol, citronelal, eugenol, mentol e safrol (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009).

A atividade antioxidante dos óleos essenciais tem sido bastante estudada. Alguns trabalhos têm demonstrado resultados aceitáveis. Bastos e Albuquerque (2004) indicaram que o óleo de pimenta-de-macaco nas concentrações, acima de 100 µg/mL, inibiu *in vitro* 100% o crescimento micelial e a germinação dos conídios. Esses autores comprovaram, também, que, na concentração de 1%, o óleo foi capaz de impedir a manifestação da antracnose em bananas. A fungitoxicidade do óleo essencial de orégano foi comprovada nas concentrações de 500 a 2000 ppm inibindo o crescimento micelial e germinação de esporos dos fungos *Corynespora cassiicola*, *Fusarium* sp., *Colletotrichum*

gloeosporioides e *Rhizoctonia solani* (ROMERO et al., 2012). Maqbool, Ali e Alderson (2010) verificaram que o óleo de canela, na concentração de 0,4%, suprimiu em 83,2% o crescimento micelial e a germinação de conídios de *C. musae*. O crescimento micelial e germinação de *C. gloeosporioides* em frutos de manga foram inibidos pela ação fungistática presente no óleo de capim-limão (DUAMKHAMANEE, 2008).

2.5 Películas biodegradáveis

Em virtude da grande preocupação ambiental com o descarte de materiais biodegradáveis não nocivos ao meio ambiente, faz-se necessária a rápida produção de filmes biodegradáveis comestíveis. Isso se deve, principalmente, à demanda pela busca de alimentos de boa qualidade e novas oportunidades para criar outros mercados consumidores de matérias-primas formadoras de filmes que prolonguem a vida útil de prateleira dos produtos (BUKZEM; SANTOS; ASCHERI, 2012).

A fécula de mandioca está entre os materiais mais utilizados para elaboração de filmes ou películas biodegradáveis (LUVIELMO, 2012). Nesse sentido, o interesse específico para a elaboração de filmes comestíveis a partir de fécula de mandioca tem aumentado por a mesma ser matéria-prima de baixo custo, transparente, com bom aspecto, resistência e brilho, sem toxicidade e pegajosidade, além de atuar como barreira à perda de água, tornando os produtos comercialmente atrativos (MALI; GROSSMANN; YAMASHITA, 2010).

A aplicação da goma de mandioca na produção de biofilmes se baseia nas propriedades químicas, físicas e funcionais da amilose para formar géis e na sua capacidade para constituir os filmes (AVEROUS; BOQUILLON, 2004). O preparo de suspensões de fécula de mandioca para o revestimento de frutos e hortaliças é realizado pelo princípio da geleificação, no qual ocorre acima de 70

°C, com agitação constante. Após a obtenção da fécula gelificada, as suspensões devem permanecer em repouso em temperatura ambiente para o seu resfriamento (HENRIQUE; PRATI, 2011).

Segundo Azeredo (2003), películas combinadas com outros métodos alternativos de controle oferecem elevado potencial de aplicações em frutos, podendo contribuir na proteção do meio ambiente e na estabilidade química, física e microbiológica dos frutos. Diversos trabalhos relatam os resultados positivos de películas em diferentes concentrações. O amadurecimento de frutos de mamão ‘Formosa Tainung1’ foi retardado, quando imersos em películas à base de fécula de mandioca, nas concentrações 1 e 3%, prolongando a vida útil pós-colheita dos frutos (PEREIRA et al., 2006). Lima et al. (2012) verificaram que o amadurecimento da manga ‘Tommy Atkins’ foi retardado com a utilização do extrato de erva-doce a 1,5% associado à fécula de mandioca a 3,0%. Serpa et al. (2014) observaram que houve redução de fitopatógenos em frutos de mangas revestidos com película de fécula a 3% combinada com extrato de cravo e canela. A combinação de 10% da película de goma arábica com 0,4% do óleo essencial de canela foi eficiente no controle pós-colheita de *Colletotrichum musae* e *Colletotrichum gloeosporioides* (MAQBOOL et al., 2011).

2.6 Aplicações da Microscopia no estudo de doenças

Nas interações planta-patógeno, a maioria dos eventos que levam ao estabelecimento das relações parasíticas ou à resistência da planta hospedeira ocorre na célula, tanto do patógeno como da planta. Para visualizar tais processos de infecção, os microscópios de luz (ML), eletrônico de transmissão (MET) e eletrônico de varredura (MEV) têm proporcionado inestimáveis contribuições (ALVES; LEITE; KITAJIMA, 2008).

Esses microscópicos são importantes ferramentas para explicarem processos relacionados ao desenvolvimento das doenças no hospedeiro como adesão, germinação, penetração, colonização e reprodução dos patógenos, bem como registrarem o modo de ação de produtos alternativos sobre as estruturas dos fitopatógenos (PEREIRA; PEREIRA, 2007).

Neste contexto, Soyulu et al. (2007) visualizaram por meio da MEV alterações morfológicas consideráveis nas hifas e escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* causadas pela ação dos óleos essenciais de orégano e erva-doce. Pereira et al. (2011) evidenciaram uma atividade direta na redução da germinação e do desenvolvimento micelial de *Cercospora coffeicola* pelo efeito fungitóxico dos óleos essenciais de citronela e canela avaliados oito e 16 horas após a inoculação. Por meio da MEV, Sharma e Tripathi (2006) observaram um afinamento da parede e redução do diâmetro das hifas em *Aspergillus niger*, além da ausência de conidióforos, promovida pela ação do óleo essencial de laranja. A utilização dos óleos essenciais de *Thymus eriocalyx* e *Thymus x-porlock* provocou um colapsamento severo nas hifas, ruptura de membrana plasmática e destruição das mitocôndrias em *Aspergillus niger* (RASOOLI; REZAEI; ALLAMEH, 2006). Os processos de penetração e colonização de *Colletotrichum musae* em bananas maduras e verdes foram observados por meio de microscopia eletrônica de varredura e microscopia eletrônica de transmissão (CHANG; ROUTREE; LEU, 2000).

REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G. N. Environmental effects on the development of infectious plant disease. In: _____. **Plant pathology**. 5th ed. Burlington: Elsevier, 2005. p. 249-257.
- ALMEIDA, G. C.; SILVA, T. **Avaliação de perdas na cadeia comercial de banana nanica, banana prata e tomate longa vida**. Belo Horizonte: CEASA-MG/FAEMG/SEBRAE-MG, 2008. 50 p.
- ALVES, E.; LEITE, B.; KITAJIMA, E. W. Ultra-estrutura na era do DNA. In: PASCHOLATI, S. F. et al. (Ed.). **Interação planta-patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular**. Piracicaba: FEALQ, 2008. p. 433-466.
- ANUÁRIO da agricultura brasileira. São Paulo: FNP Consultoria & Comércio, 2016. 299 p.
- AVEROUS, L.; BOQUILLON, N. Biocomposites based on plasticized starch: thermal and mechanical behaviors. **Carbohydrate Polymero**, England, v. 56, n. 2, p. 111-122, 2004.
- AWAD, M. **Fisiologia pós-colheita de frutos**. São Paulo: Nobel, 1993. 114 p.
- AZEREDO, H. M. C. Películas comestíveis em frutas conservadas por métodos combinados: potencial de aplicação. **Boletim CEPPA**, Curitiba, v. 21, n. 2, p. 267-278, 2003.
- BASTOS, C. N.; ALBUQUERQUE, P. S. B. Efeito do óleo de *Piper aduncum* no controle em pós-colheita de *Colletotrichum musae* em banana. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 5, p. 555-557, 2004.
- BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 588-594, Abril. 2009.
- BORGES, A. L.; SOUZA, L. S. Exigências edafoclimáticas. In: _____. **O cultivo da bananeira**. Cruz das Almas: EMBRAPA, 2004. p. 15-23.

- BUKZEM, A. D. L.; SANTOS, D. M. D.; ASCHERI, D. P. R. Filmes biodegradáveis a base de fécula de mandioca e bagaço de cevada obtidos por extrusão termoplástica. **Revista Agrotecnologia**, Goiânia, v. 3, n. 2, p. 89-107, 2012.
- CHANG, H. C.; ROUTREE, R. L.; LEU, L. S. Electron microscopic observation of unripe banana fruit infected with *Colletotrichum musae*. **Plant Protection Bulletin**, Kuala Lumpur, v. 42, n. 3, p. 135-146, 2000.
- CHILLET, M. et al. Effects of the physiological age of bananas on their susceptibility to wound anthracnose due to *Colletotrichum musae*. **Plant Disease**, Quebec, v. 90, n. 9, p. 1181-1185, 2006.
- CORDEIRO, Z. J. M.; MATOS, A. P.; KIMATI, H. Doenças da bananeira. In: KIMATI, H. et al. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Ceres, 2005. v. 2, p. 99-117.
- CORDEIRO, Z. J. M.; MATOS, A. P.; MEISSNER FILHO, P. E. Doenças e métodos de controle. In: BORGES, A. L.; SOUZA, L. S. (Ed.). **O cultivo da bananeira**. Cruz das Almas: EMBRAPA-CNPMF, 2004. p. 146-182.
- COSTA, D. M.; ERABADUPITIYA, H. R. U. T. An integrated method to control postharvest diseases of banana using a member of the *Burkholderia cepacia* complex. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 36, n. 1, p. 31-39, 2005.
- CRONQUIST, A. The divisions and classes of plants. **Botanical Review**, New York, v. 26, n. 4, p. 425-482, 1981.
- DENARDI, F.; BERTON, O.; SPENGLER, M. M. Resistência genética à podridão-amarga em maçãs, determinada pela taxa de desenvolvimento da doença em frutos com e sem ferimentos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 3, p. 494-497, 2003.
- DUAMKHAMANEE, R. Natural essential oils from lemon grass (*Cymbopogon citratus*) to control postharvest anthracnose of mango fruit. **International Journal of Biotechnology**, London, v. 10, n. 1, p. 104-108, 2008.
- DURIGAN, M. F. B.; MATTIUZ, B. H.; DURIGAN, J. F. Injúrias mecânicas na qualidade pós-colheita de lima ácida 'Tahiti' armazenada sob condição ambiente. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 27, n. 3, p. 369-372, 2005.

FACHINELLO, J. C. et al. Situação e perspectivas da fruticultura de clima temperado no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. S1, p. 109-120, Out. 2011.

FERRARI, J. T. et al. Ocorrência da sigatoka negra em bananeiras no Estado de São Paulo. **Revista Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 72, n. 1, p. 133-134, 2005.

FIORAVANÇO, J. C. Mercado mundial da banana: produção, comércio e participação brasileira. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 33, n. 10, p. 15-27, 2003.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Produção de banana, 2013**. Disponível em: <<http://www.fao.org/>>. Acesso em: 10 fev. 2016.

GAMAGAE, S. U. et al. Use of sodium bicarbonate and *Candida oleophila* to control anthracnose in papaya during storage. **Crop Protection**, Amsterdam, v. 22, n. 7, p. 775-779, 2003.

HENRIQUE, C. M.; PRATI, P. Uso de biofilmes de amido em raízes de mandioca minimamente processadas. **Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha**, Hermosillo, v. 12, n. 2, p. 227-236, 2011.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção agrícola municipal, 2015**. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: 22 fev. 2016.

LIMA, A. B. et al. Conservação pós-colheita de manga ‘Tommy Atkins’ orgânica sob recobrimentos bio-orgânicos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 34, n. 3, p. 704-710, 2012.

LUVIELMO, M. M. Revestimentos comestíveis em frutas. **Estudos Tecnológicos em Engenharia**, São Leopoldo, v. 8, n. 1, p. 8-15, jan./jun 2012.

MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E.; YAMASHITA, F. Starch films: production, properties and potential of utilization. **Semina-Ciencias Agrarias**, Londrina, v. 31, n. 1, p. 137-55, jan./mar. 2010.

MAQBOOL, M.; ALI, A.; ALDERSON, P. G. Effect of cinnamon oil on incidence of anthracnose disease and postharvest quality of bananas during storage. **International Journal of Agriculture & Biology**, Pakistan, v. 12, n. 4, p. 516-520, July 2010.

MAQBOOL, M. et al. Postharvest application of gum arabic and essential oils for controlling anthracnose and quality of banana and papaya during cold storage. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 62, n. 1, p. 71-76, Oct. 2011.

MENEZES, M. Aspectos biológicos e taxonômicos de espécies do gênero *Colletotrichum*. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, Recife, v. 3, p. 170-179, 2006.

MORAES, W. D. S. et al. Termoterapia de banana 'Prata-Anã' no controle de podridões em pós-colheita. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 6, p. 603-608, 2005.

OLIVEIRA, E. S. et al. **Alternativas limpas para controle da podridão pós-colheita causada por *Colletotrichum* em banana**. Fortaleza: EMBRAPA Agroindústria Tropical, 2013. 8 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 83).

OLIVEIRA, M. J. D. et al. Effects of wounding, humidity, temperature, and inoculum concentrations on the severity of corky dry rot caused by *Fusarium semitectum* in melon fruits. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 36, n. 3, p. 281-289, jul./sep. 2014.

PEREIRA, J. C. R. et al. Ocorrência do mal-do-panamá em bananeira do subgrupo Figo, em Piau, Minas Gerais. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 5, p. 554, 2005.

PEREIRA, M. E. C. et al. Amadurecimento de mamão formosa com revestimento comestível à base de fécula de mandioca. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 6, p. 1116-1119, 2006.

PEREIRA, O. L.; PEREIRA, J. F. Microscopia e suas aplicações no estudo das interações fungo-planta. In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. (Ed.). **Métodos em fitopatologia**. Viçosa, MG: UFV, 2007. p. 221-252.

PEREIRA, R. B. et al. Potential of essential oils for the control of brown eye spot in coffee plants. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 1, p. 115-123, jan./fev. 2011.

PERES, N. A. R. et al. Identification and characterization of *Colletotrichum* spp. affecting fruit after harvest in Brazil. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 150, n. 3, p. 128-134, 2002.

RASOOLI, I.; REZAEI, M. B.; ALLAMEH, A. Growth inhibition and morphological alterations of *Aspergillus niger* by essential oils from *Thymus eriocalyx* and *Thymus x-porlock*. **Food Control**, Amsterdam, v. 17, n. 5, p. 359-364, 2006.

ROMERO, A. L. et al. Composição química e atividade do óleo essencial de *Origanum vulgare* sobre fungos fitopatogênicos. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 14, n. 4, p. 231-235, Maio. 2012.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. S. Uso de plantas medicinais no controle de doenças de plantas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 1, p. 54-56, 2003.

SENHOR, R. F. et al. Influência do método de inoculação, intensidade do ferimento e idade do fruto na severidade da podridão-de-cratera em melão. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 34, n. 3, p. 232-237, Abril. 2008.

SERPA, M. F. P. et al. Conservação de manga com uso de fécula de mandioca preparada com extrato de cravo e canela. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 61, n. 6, p. 975-982, nov./dez. 2014.

SERRA, I. M. R. S. et al. Diversidade fenotípica e patogênica de *Colletotrichum*, agente causal de antracnose em mangueira, e identificação de espécie. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 37, n. 1, p. 42-51, jan./mar. 2011.

SHARMA, N.; TRIPATHI, A. Fungitoxicity of the essential oil of *Citrus sinensis* on post-harvest pathogens. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 22, n. 6, p. 587-593, 2006.

SILVA, S. O.; SANTOS-SEREJO, J. A.; CORDEIRO, Z. J. M. Variedades. In: BORGES, A. L.; SOUZA, L. da S. (Ed.). **O cultivo da bananeira**. Cruz das Almas: EMBRAPA-CNPMPF, 2004. p. 45-47.

SILVA, A. D. et al. Efeito *in vitro* de compostos de plantas sobre o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* Penz: isolado do maracujazeiro. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, n. spe, p. 1853-1860, Set. 2009.

SOARES, A. R.; LOURENÇO, S. A.; AMORIM, L. Infecção de goiabas por *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum acutatum* sob diferentes temperaturas e períodos de molhamento. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 33, n. 4, p. 265-272, Jul./ago. 2008.

SOMMER, N. F. Postharvest handling practices and postharvest diseases of fruit. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 66, n. 4, p. 357-364, 1982.

SOYLU, S. et al. Antifungal effects of essential oils from oregano and fennel on *Sclerotinia sclerotiorum*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 103, n. 4, p. 1021-1030, 2007.

STADNIK, M. J.; RIVERA, M. C. **Ódios**. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 2001. 484 p.

VENTURA, J. A.; COSTA, H.; TATAGIBA, J. S. Manejo de doenças do mamoeiro. In: MARTINS, D. dos S.; COSTA, A. de F. S. da (Ed.). **A cultura do mamoeiro: tecnologias de produção**. Vitória: INCAPER, 2003. p. 229-307.

WOGGUM, T.; SIRIVONGPAISAL, P.; WITTAYA, T. Properties and characteristics of dual-modified rice starch based biodegradable films. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 67, p. 490-502, June 2014.

CAPÍTULO 2

MÉTODOS DE INOCULAÇÃO E PERÍODOS DE MOLHAMENTO NO DESENVOLVIMENTO DE LESÕES CAUSADAS POR *COLLETOTRICHUM MUSAE* EM BANANAS

RESUMO

A bananeira é uma frutífera cultivada mundialmente em regiões tropicais e subtropicais. No entanto, a produção e a comercialização dessa fruta são prejudicadas, em função das doenças pós-colheita, sendo a mais expressiva a antracnose. Diante da necessidade do conhecimento de fatores que influenciam a antracnose, objetivou-se, com este trabalho, avaliar diferentes métodos de inoculação e períodos de molhamento no desenvolvimento de lesões de *Colletotrichum musae* em bananas. O isolado obtido de banana foi identificado, por meio de caracteres morfológicos e moleculares, utilizando as regiões gênicas GAPDH e ACT. O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado, com 25 tratamentos e quatro repetições. Utilizou-se esquema fatorial de análise de variância 5 x 5, com 5 períodos de molhamento (0, 6, 12, 24 e 48 h), combinados com 5 métodos de inoculação, um furo com micélio (1 FM), um furo com suspensão (1FS), cinco furos com micélio (5FM), cinco furos com suspensão (5FS) e corte com suspensão (CS). Bananas foram inoculadas com suspensão ou discos de micélio, conforme os tratamentos, em quatro pontos distintos. Os ferimentos foram efetuados com multiagulhas, agulha e lâmina de bisturi. As avaliações foram realizadas, diariamente, medindo-se as lesões em dois sentidos opostos, com paquímetro digital. O isolado apresentou características morfológicas de *C. musae*. Nas análises filogenéticas, o isolado agrupou dentro do complexo de espécies *Colletotrichum gloeosporioides* e no mesmo clado que a espécie *C. musae*. Houve interação entre as variáveis estudadas. O aumento das lesões foi favorecido pelo método de inoculação 5FS, sendo 0,86, 0,97, 1,84, e 5,85 cm² nos períodos de molhamento 6, 12, 24 e 48 h, respectivamente. As menores lesões foram observadas nos métodos de inoculação 1FS e 1FM. O aumento do molhamento de 0 para 48 h, influenciou o acréscimo das lesões. Portanto, o método de inoculação 5FS combinado com 48 h de molhamento contribui para o desenvolvimento de lesões em bananas.

Palavras-chave: *Musa* spp.. Antracnose. Pós-colheita. Infecção.

ABSTRACT

The banana is a fruit grown worldwide in tropical and subtropical regions. However, the production and commercialization of this fruit is impaired, depending on the postharvest diseases, the most significant anthracnose. Faced with the need to know the factors that influence anthracnose, is aimed with this study was to evaluate different methods of inoculation and wet periods in the development of *Colletotrichum musae* lesions in bananas. The isolate obtained from banana was identified by morphological and molecular characters, using the genic regions GAPDH and ACT. The experiment was conducted in a completely randomized design with 25 treatments and four replications. It was used factorial analysis of variance 5 x 5 to 5 wetting periods (0, 6, 12, 24 and 48 h) combined with 5 methods of inoculation, a hole with mycelium (1 FM), a hole suspension (1FS), five holes with mycelium (5FM), five holes with suspension (5FS) and cut with suspension (CS). Bananas were inoculated with suspension or mycelial discs as treatments in four different points. The wounds were made with multiagulhas, needle and scalpel blade. Evaluations were performed daily, the lesions were measured in two opposite directions, with a digital caliper. The isolated morphological features of *C. musae*. In the phylogenetic analysis, the isolated grouped within the species complex *Colletotrichum gloeosporioides* and in the same clade the species *C. musae*. There was interaction between variables. The increase of lesions was favored by 5FS method of inoculation, with 0.86, 0.97, 1.84, and 5.85 cm² for periods of wetness 6, 12, 24 and 48 h, respectively. The larger lesions were observed in 1FS and 1FM inoculation methods. The increased wetting of 0 to 48 h, influenced the increase of lesions. Therefore, the method of inoculation 5FS combined with wetting 48 h contributes to the development of lesions bananas.

Keywords: *Musa* spp.. Anthracnose. Postharvest. Infection.

1 INTRODUÇÃO

A banana (*Musa* spp.) é uma fruta altamente nutritiva, consumida mundialmente principalmente na forma ao natural. É cultivada na maioria dos países tropicais e subtropicais (BOTREL et al., 2002). A produção mundial de banana, em 2013, foi de 106 milhões de toneladas (FAO, 2016). Vários fatores prejudicam a produção e comercialização das frutas, entre eles citam-se os significativos danos pós-colheita, podendo esses ocorrer principalmente devido a fatores de origem microbiológica (PESSOA et al., 2007).

Dentre os fatores microbiológicos, estão os agentes patogênicos, fungos, bactérias, vírus e nematoides, que afetam o desenvolvimento da bananeira, destacando-se o fungo *Colletotrichum musae*, agente etiológico da antracnose, o qual ocasiona perdas em torno de 30 a 40% em frutas e inviabiliza a comercialização (MAQBOOL; ALI; ALDERSON, 2010). Essa doença é caracterizada por lesões escuras deprimidas que coalescem com o passar do tempo formando grandes áreas necróticas. Sob condições ideais de umidade, ocorre formação de frutificações rosadas sobre as frutas. A polpa não é afetada, exceto quando bananas são expostas a temperaturas altas (CORDEIRO; MATOS; KIMATI, 2005). De acordo com Bastos e Albuquerque (2004), as doenças pós-colheita em banana são de suma importância e, de modo geral, são favorecidas por temperaturas médias de 25 a 30 °C e alta umidade. Todavia, na ausência desses fatores, o desenvolvimento da doença é reduzido (OLIVEIRA et al., 2014b).

Na interação patógeno-hospedeiro, é importante o conhecimento das condições favoráveis aos fitopatógenos para cada patossistema, tais como o período de molhamento e a porcentagem de umidade relativa do ar para o estabelecimento da doença (PESSOA et al., 2007).

Outro fator importante no desenvolvimento de lesões em frutas de bananas é a inoculação, na qual possibilita a ocorrência de sintomas e auxilia em estudos relacionados à confirmação ou manutenção da patogenicidade (SIVIERO et al., 2002.). Diversos trabalhos elucidaram o efeito da inoculação e do molhamento sobre o desenvolvimento de doenças fúngicas (PESSOA et al., 2007; SILVEIRA et al., 2001; UCHÔA et al., 2012). Todavia, estudos envolvendo espécies de *Colletotrichum*, ainda, são escassos, principalmente, na pós-colheita de bananas. Diante do exposto, objetivou-se, com este trabalho, avaliar a influência de métodos de inoculação e períodos de molhamento no desenvolvimento de lesões de *Colletotrichum musae* em bananas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Microscopia e Análise Ultraestrutural do Departamento de Fitopatologia (DFP) da Universidade Federal de Lavras (UFLA). A caracterização molecular do isolado de banana foi realizada no Laboratório de Sistemática e Ecologia de Fungos da UFLA.

2.1 Obtenção do isolado incorporação a coleção micológica e caracterização morfológica e molecular

O isolado foi obtido de banana cultivar Prata, proveniente do Sítio Vale dos Ventos, município de Lavras, MG. Pequenos fragmentos lesionados foram desinfestados em álcool 70% por 30 s, hipoclorito de sódio a 2% por 1 min, lavados com água esterilizada por três vezes e secados em papel de filtro esterilizado. Em seguida, os fragmentos foram transferidos para placas de Petri, contendo meio malte e mantidos em câmara de crescimento tipo BOD a 25 °C com fotoperíodo de 12 h.

Para a obtenção da cultura monospórica, conídios do fungo foram diluídos em 10 mL de água esterilizada, sendo, posteriormente, extraída uma alíquota de 10 µL, a qual foi depositada em placas de Petri de 9 cm de diâmetro, contendo meio ágar-água e espalhada com uma alça de Drigalski. As placas foram incubadas em BOD, regulada a 25 °C, com fotoperíodo de 12 h. Após a germinação, com auxílio de microscópio de luz e agulha histológica, conídios isolados foram transferidos para placas de Petri contendo meio malte. Em seguida, a cultura monospórica foi depositada à Coleção Micológica de Lavras (CML), do Departamento de Fitopatologia da UFLA, com código ABA20 (CML3248).

A caracterização morfológica do isolado foi realizada, por meio de avaliações das características morfológicas das colônias e preparo de lâminas não permanentes para observações no microscópio de luz dos conídios. Posteriormente foi feita medições do comprimento e largura dos conídios.

Para caracterização molecular, a cultura monospórica do isolado ABA20 foi cultivada em meio malte 2% líquido por três dias. Para a extração do DNA, o micélio do isolado foi filtrado em gaze, lavado com água destilada estéril e submetido à extração do DNA genômico, utilizando o kit Wizard Genomic DNA Purification Kit® (Promega), de acordo com o protocolo do fabricante. A concentração de DNA foi mensurada, utilizando o NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc.) e padronizada para 5 ng/μL. As reações de PCR foram realizadas, utilizando-se o kit Promega GoTaq® Colorless Master Mix, no termociclador My Cycler™ (Bio-Rad) e o mesmo conjunto de primers foi utilizado para a reação de sequenciamento. O fragmento do gene gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foi amplificado, utilizando-se os *primers* GDF (*forward*; 5'- GCC GTC AAC GAC CCC TTC ATT GA- 3') e GDR (*reverse*; 5'- GGG TGG AGT CGT ACT TGA GCA TGT- 3') (Templeton et al.,1992) e as seguintes condições de ciclo: (1) desnaturação, por 4 min, a 94 °C, seguido por 34 ciclos de desnaturação, a 94 °C, por 45 s; (2) anelamento, por 45 s, a 60 °C; (3) extensão, a 72 °C, por 1 min; (4) extensão final, a 72 °C por 7 min (PRIHASTUTI et al., 2009). O gene Actina parcial (ACT) foi amplificado, utilizando-se os *primers* ACT-512F (*forward*; 5'- ATG TGC AAG GCC GGT TTC GC- 3') e ACT-783R (*reverse*; 5'- TAC GAG TCC TTC TGG CCC AT- 3') Carbone e Kohn (1999) e as seguintes condições de ciclo: (1) desnaturação, a 95 °C durante 5 min, seguido por 35 ciclos a 94 °C durante 30 s; (2) anelamento, a 58 °C durante 30 s; (3) extensão, a 72 °C durante 45 s; (4) extensão final, a 72 °C durante 7 min (WEIR; JOHNSTON; DAMM, 2012;). Os fragmentos

amplificados foram purificados com o kit Wizard® SV gel e PCR Clean-Up System (Promega) seguindo as instruções do fabricante.

Amostras de DNA amplificadas, para as regiões GAPDH e Actina, foram enviadas para Macrogen Corporation, nos Estados Unidos da América (EUA), para a obtenção do sequenciamento. Após obter as sequências, elas foram editadas utilizando-se o programa SeqAssem ver. 07/2008 (SequentiX). Sequências adicionais de membros do complexo de espécies *Colletotrichum gloeosporioides* Weir, Johnston e Damm (2012) foram obtidas a partir do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) (Tabela 1). As sequências foram alinhadas usando MUSCLE implementado no MEGA 5 (TAMURA et al., 2011).

As análises filogenéticas, para os genes individuais GAPDH e ACT e para o conjunto de dados combinados desses dois genes, foram realizadas pelo método de Máxima Parcimônia (MP), com teste de bootstrap de 1000 repetições, utilizando-se o programa MEGA 5.

Tabela 1 Isolados de referência de *Colletrotrichum*, depositadas no GenBank representando espécies conhecidas, utilizados para comparação nas análises filogenéticas

Espécie	Código Isolado	Hospedeiro	Local	Número de acesso no GenBank	
				GAPDH	ACT
<i>C. dianesei</i>	CMM 4083	<i>Mangifera indica</i>	Brasil-SFV	KC517194	KC517254
<i>C. endophytica</i>	MFLUCC 10.0676	Fruto desconhecido	Tailândia	KF242181	KF254857
<i>C. fructicola</i>	ICMP 18613	<i>Limonium sinuatum</i>	Israel	JX009998	JX009491
<i>C. fructicola</i>	ICMP 18581	<i>Coffea arabica</i>	Tailândia	JX010033	FJ907426
<i>C. gloeosporioides</i>	CMP 17821	<i>Citrus sinensis</i>	Itália	JX010056	JX009531
<i>C. siamense</i>	ICMP 18578	<i>Coffea arabica</i>	Tailândia	JX009924	FJ907423
<i>C. endomangiferae</i>	CMM 3814	<i>Mangifera indica</i>	Brasil-SP	KC02955	KC702922
<i>C. siamense</i>	ICMP 17795	<i>Malus domestica</i>	USA	JX010051	JX009506
<i>C. siamense</i>	ICMP 18121	<i>Dioscorea rotundata</i>	Nigéria	JX009942	X009460
<i>C. theobromicola</i>	ICMP 18649	<i>Theobroma cacao</i>	Panamá	JX010006	JX009444
<i>C. theobromicola</i>	ICMP 17895	<i>Annona diversifolia</i>	México	JX010057	JX009568
<i>C. viniferum</i>	GZAAS5.08601	<i>V. vinifera</i> cv. Shuijing	China	JN412798	JN412795
<i>C. viniferum</i>	GZAAS5.08601	<i>V. vinifera</i> cv. Shuijing	China	JN412796	JN412812

2.2 Teste de patogenicidade

No teste de patogenicidade, foram utilizadas cinco bananas cv. Prata em estágio de maturação 3 (BRASIL, 2008). As frutas foram, previamente, lavadas em água corrente e desinfestadas com hipoclorito de sódio a 2% por 3 min. Após essa etapa, foram aplicados, em diferentes pontos contendo furos de 2 mm de profundidade, 20 µL de suspensão na concentração ajustada para 2×10^6

conídios/mL. As frutas foram envolvidas com sacos plásticos sob temperatura e umidade relativa média de 25 ± 2 °C e $90 \pm 5\%$, respectivamente. Após remoção dos sacos plásticos, as frutas permaneceram em bancada até o desenvolvimento das lesões.

2.3 Influência de métodos de inoculação e períodos de molhamento no desenvolvimento de lesões ocasionadas por *Colletotrichum musae* em bananas

Bananas ‘Prata’, no estágio de maturação 3, foram lavadas em água corrente com detergente e desinfestadas com hipoclorito de sódio a 2% por 3 min e secadas em papel toalha. Foram marcados quatro pontos distintos, na região mediana das frutas e realizados ferimentos de 2 mm de profundidade com agulha (um furo), multiagulhas (cinco furos) e lâmina de bisturi (um corte). Em cada ponto foram aplicados 20 µL da suspensão, contendo 2×10^6 conídios/mL ou discos de micélio de 5 mm de diâmetro, conforme os métodos inoculação de um furo com micélio (1 FM), um furo com suspensão (1FS), cinco furos com micélio (5FM), cinco furos com suspensão (5FS) e corte com suspensão (CS). A duração do tempo de molhamento foi obtida envolvendo as frutas com sacos plásticos transparentes e umedecidos, de modo a formar uma câmara úmida com temperatura e umidade relativa média de 25 ± 2 °C e $90 \pm 5\%$, respectivamente, durante o período determinado no tratamento. Os períodos de molhamento testados foram de 0, 6, 12, 24 e 48 h. Após a retirada dos sacos plásticos, as frutas foram colocadas em bancada do laboratório e avaliadas, diariamente, durante seis dias, com auxílio de um paquímetro digital, medindo-se as lesões em duas direções perpendiculares. Em seguida, foi calculada a área média lesionada em cm². Pelo fato das lesões terem sido circulares, utilizou-se a fórmula para cálculo da área do círculo: $A = \pi r^2$.

Em que A = área lesionada; π = constante com valor (3,1416) e r = raio médio da lesão.

O delineamento estatístico utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial de análise de variância 5 x 5 (métodos de inoculação e períodos de molhamento), com quatro repetições por tratamento e uma fruta por parcela.

2.4 Análise dos dados

Os dados foram analisados quanto às pressuposições da análise de variância (ANOVA) utilizando o software R. Posteriormente os dados das variáveis foram submetidos à análise de variância, em esquema fatorial 5 x 5, com 5 métodos de inoculação e 5 períodos de molhamento. As variáveis significativas no teste F ($p \leq 0,05$) foram submetidas ao teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade e ao ajuste de modelos de regressão empregando o software Sisvar (FERREIRA, 2008).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização morfológica e molecular do isolado de banana

Os aspectos morfológicos visualizados, para o isolado de banana, foram colônias com cor rosada e produção de massas de conídios no centro das colônias de coloração salmão. Os conídios foram hialinos, unicelulares, retos, curtos elípticos e cilíndricos, com extremos arredondos a oblongos, medindo 13-14 μm de comprimento e 4,5-5,4 μm de largura. Esses resultados foram semelhantes aos obtidos por vários autores utilizando isolados provenientes de bananas (WEIR; JOHNSTON; DAMM, 2012; GAÑÁN; ÁLVAREZ; CASTAÑO-ZAPATA, 2015).

A análise filogenética preliminar, com base na sequência parcial do gene GAPDH obtida para o isolado ABA20, revelou o agrupamento do isolado no complexo de espécies *Colletrotrichum gloeosporiodes*. O isolado, também, agrupou no mesmo clado que o isolado representante da espécie *Colletrotrichum musae*, entretanto, com suporte de bootstrap de 35% não sendo suficiente para discriminar o isolado de banana ao nível de espécie (Figura 1A).

Em função dos resultados da região GAPDH, outra região gênica denominada de ACT foi analisada com o intuito de obter uma melhor resolução para a identificação do isolado. Os agrupamentos gerados por essa análise estão demonstrados na Figura 1B, evidenciando agrupamento do isolado de banana dentro do complexo 'gloeosporiodes' e um grupo monofilético bem suportado (bootstrap 86%) formado pelo isolado ABA20 e dois isolados representantes da espécie *C. musae* (CBS 207.80 e C1266.11).

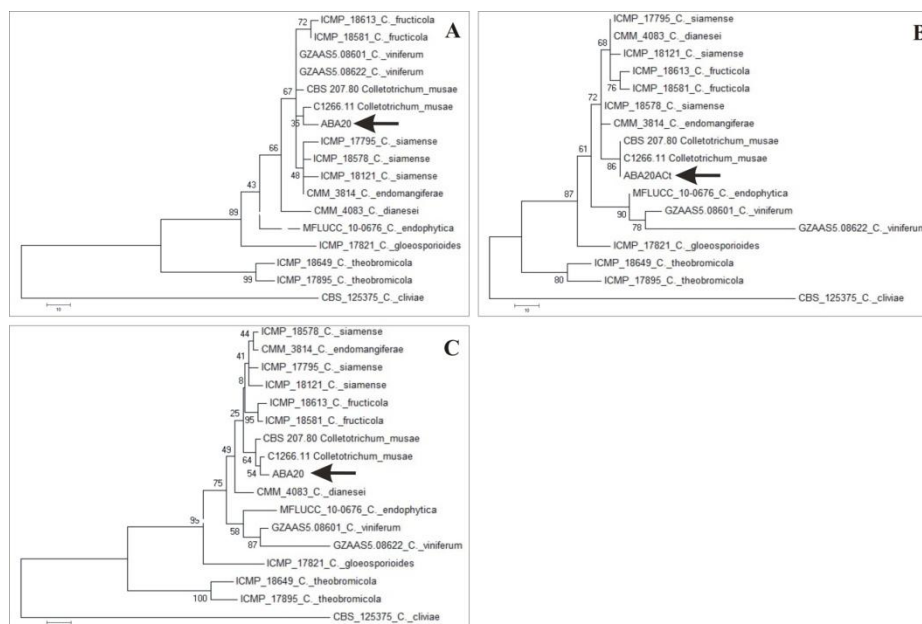


Figura 1 Árvores filogenéticas de Máxima Parcimônia para o isolado ABA20, baseadas em sequências gênicas individuais da região GADPH (A), ACT (B) e sequências combinadas dos genes GADPH e ACT (C). *C. cliviae* foi utilizado como outgroup. Os valores de bootstrap com 1.000 repetições são indicados em porcentagem acima e abaixo dos nós

Como não foi observado nenhum conflito entre as topologias das árvores filogenéticas individuais, obtidas com base nos genes GAPDH e ACT, as sequências das duas regiões foram combinadas e analisadas. A topologia da árvore filogenética multigênica foi semelhante a das árvores dos genes individuais e ela possibilitou o agrupamento do isolado ABA20, dentro do complexo ‘gloeosporioides’ e no mesmo clado pertencente à espécie *C. musae*, confirmando a identificação do isolado a essa espécie com suporte de 54% (Figura 1C).

Resultados semelhantes foram obtidos por outros autores. Weir, Johnston e Damm (2012) realizaram análises filogenéticas com as regiões GAPDH e ACT dentre outras para a identificação de isolados provenientes de

bananas dos países Quênia, Nova Zelândia, Indonésia, Filipinas e Estados Unidos e confirmaram que todos os isolados pertencem ao complexo ‘gloeosporioides’ e a espécie *C. musae*, pois agruparam em um mesmo clado. Recentemente, Gañán, Álvarez e Castaño-Zapata (2015) estudaram a caracterização filogenética de cinco isolados de banana com sintomas de podridão oriundas da Colômbia, com as regiões gênicas ITS, GAPDH e TUB2, e constataram agrupamento dos isolados com a espécie de *C. musae*, dentro do complexo de espécies *Colletrotrichum gloeosporioides*. Esses autores foram os primeiros a relatarem, na Colômbia, que *C. musae* é o agente etiológico causador de antracnose em banana.

3.2 Teste de patogenicidade

O isolado ABA20, utilizado no presente estudo, mostrou-se patogênico em todas as bananas inoculadas. Foram observadas lesões escuras deprimidas delimitando todos os pontos inoculados na superfície externa das frutas, e o controle inoculado apenas com água destilada sem nenhuma lesão (Figura 2). Esses resultados comprovam a patogenicidade da espécie identificada e confirmam o agente etiológico da doença antracnose em banana.

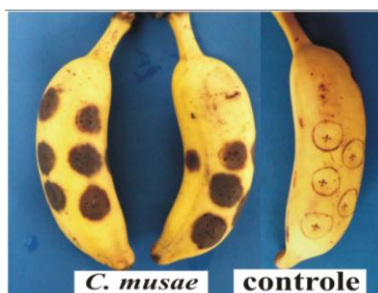


Figura 2 Sintomas típicos de antracnose em bananas inoculadas com *Colletrotrichum musae* e o controle inoculado apenas com água destilada

3.3 Influência dos métodos de inoculação no desenvolvimento das lesões

Os dados obedeceram às pressuposições da ANOVA e houve interação significativa ($p \leq 0,05$) entre métodos de inoculação e períodos de molhamento.

O maior desenvolvimento das lesões foi obtido no método de inoculação cinco furos com suspensão (5FS), sendo estas incrementadas com o acréscimo do período de molhamento, assumindo valores de 0,86, 0,97, 1,84 e 5,85 cm², nos períodos de molhamento 6, 12, 24 e 48 h, respectivamente (Gráfico 1). Resultados semelhantes foram verificados por Pessoa et al. (2007), ao observarem que o método de inoculação com ferimentos, utilizando furos com suspensão, proporcionou as maiores lesões de *C. musae* em bananas. Frutos de melão inoculados com ferimentos e pulverização com suspensão tiveram maiores lesões de podridão-de-cratera causada por *Myrothecium roridum* (Senhor et al., 2008). Oliveira et al. (2014a) constataram em frutos de meloeiro aumento de lesões quando os mesmos foram submetidos a ferimentos e inoculados pela atomização da suspensão de conídios de *Fusarium semitectum*. Esses autores verificaram que não ocorreu podridão nos melões quando inoculados sem ferimentos. O estabelecimento e desenvolvimento da podridão amarga e da podridão-branca em maçãs foram mais intensos quando essas foram inoculadas na presença de ferimentos (DENARDI; BERTON; SPENGLER, 2003; SANTOS et al., 2008). Aquino et al. (2012) constataram, em maracujá, maior progressão da doença quando os frutos maduros foram inoculados com suspensão de conídios de *C. gloeosporioides*.

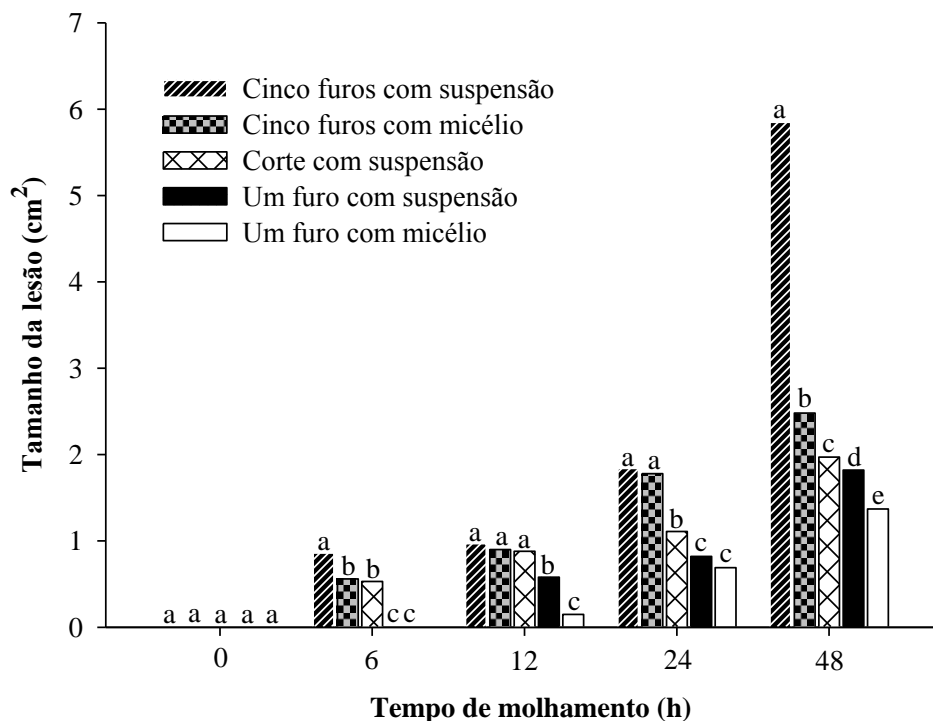


Gráfico 1 Tamanho da lesão em bananas ocasionada por *Colletotrichum musae* sobre diferentes métodos de inoculação e períodos de molhamento após seis dias da inoculação. Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Scott- Knott a 5% de probabilidade. CV(%)= 9,20

O método de inoculação cinco furos com micélio (5FM) apresentou um expressivo desenvolvimento de lesões com o aumento do período de molhamento, não diferindo estatisticamente da inoculação (5FS), nos períodos de molhamento 0, 12 e 24 h, obtendo lesões médias de 0,00, 0,90 e 1,78 cm², repetitivamente (Gráfico 1). Esses resultados corroboram com diversos outros trabalhos. Moraes, Zambolim e Lima (2006) constataram em bananas ‘Prata-Anã’ inoculadas com discos de micélio área lesionada de 5,8 cm². O método de inoculação, com disco de micélio de *Phytophthora parasitica*, sob a casca de plântulas e plantas jovens de citros, favoreceu maior progresso da doença

(SIVIERO et al., 2002). Oliveira et al. (2008) observaram, em manga, maiores lesões nas inoculações realizadas com discos contendo estruturas do fitopatógeno, e menores lesões com a utilização da suspensão. Já Nery-Silva et al. (2007) evidenciaram maior severidade de podridão peduncular em mamão quando inoculados com ferimentos e suspensão dos fungos *Phoma caricae-papayae*, *C. gloeosporioides*, *Botryodiplodia theobromae* e *Fusarium solani*.

Ferimentos mais intensos e, em maiores quantidades em frutos, são essenciais para o desenvolvimento de maiores lesões, pois facilita a penetração do patógeno (SENHOR et al., 2008). Além disso, ferimentos associados com suspensão e micélio incrementam mais ainda o contato do patógeno com o hospedeiro. A vantagem no uso de suspensão de conídios pode ser explicada pela fácil padronização da quantidade de esporos depositada na superfície do fruto, que auxilia diretamente no início da infecção. Já a utilização de disco de micélio é vantajosa pela presença de estruturas do patógeno, que apresenta uma fonte extra de substrato quando introduzido no hospedeiro através de ferimentos (PESSOA et al., 2007).

Nos métodos de inoculação corte com suspensão (CS), um furo com suspensão (1FS) e um furo com micélio (1FM), foram observadas as menores áreas lesionadas. Nos dois últimos métodos, não foi verificado desenvolvimento de lesões nos períodos de molhamento de 0 e 6 h, tendo início o aparecimento das primeiras lesões a partir de 12 h de molhamento, com tamanhos de 0,58 e 0,15 cm², respectivamente (Gráfico 1). De forma semelhante, Soares, Lourenço e Amorim (2008) verificaram, em frutos de goiaba, germinação de *C. gloeosporioides* mais intensa com 12 h de molhamento, e ausência de infecção do patógeno com 6 h. Assim, torna-se nítida a importância da quantidade de ferimentos, para o progresso da antracnose em banana, pois quanto menor o número de ferimentos menor será o desenvolvimento da doença, fato confirmado neste estudo.

3.4 Influência dos períodos de molhamento no desenvolvimento das lesões

O aumento do período de molhamento proporcionou o desenvolvimento linear das lesões em bananas (Gráfico 2). À medida que aumentou o período de molhamento de 0 para 48 h, verificou-se acréscimo no tamanho das lesões de 0,030; 0,039; 0,118; 0,050 e 0,038 cm² para cada aumento na unidade de hora do molhamento, nos métodos de inoculação 1FM, 1FS, 5FS, 5FM e CS, respectivamente (Gráficos 2A, 2B, 2C, 2D e 2E).

A alta umidade estimulou o processo da infecção de *C. musae* e o progresso das lesões (Gráfico 2). Da mesma forma, Pessoa et al. (2007) observaram maior desenvolvimento de lesões de *C. musae*, em banana, com o incremento do período de molhamento, sendo as maiores lesões constatadas no período de 36 h. Oliveira et al. (2014b) verificaram, em frutos de mamão, maiores lesões causadas por *Phytophthora palmivora* quando submetidos aos períodos de molhamento entre 48 e 78 h. Uchôa et al. (2012) verificaram aumento na severidade da sigatoka-negra em banana com 72 h de umidade.

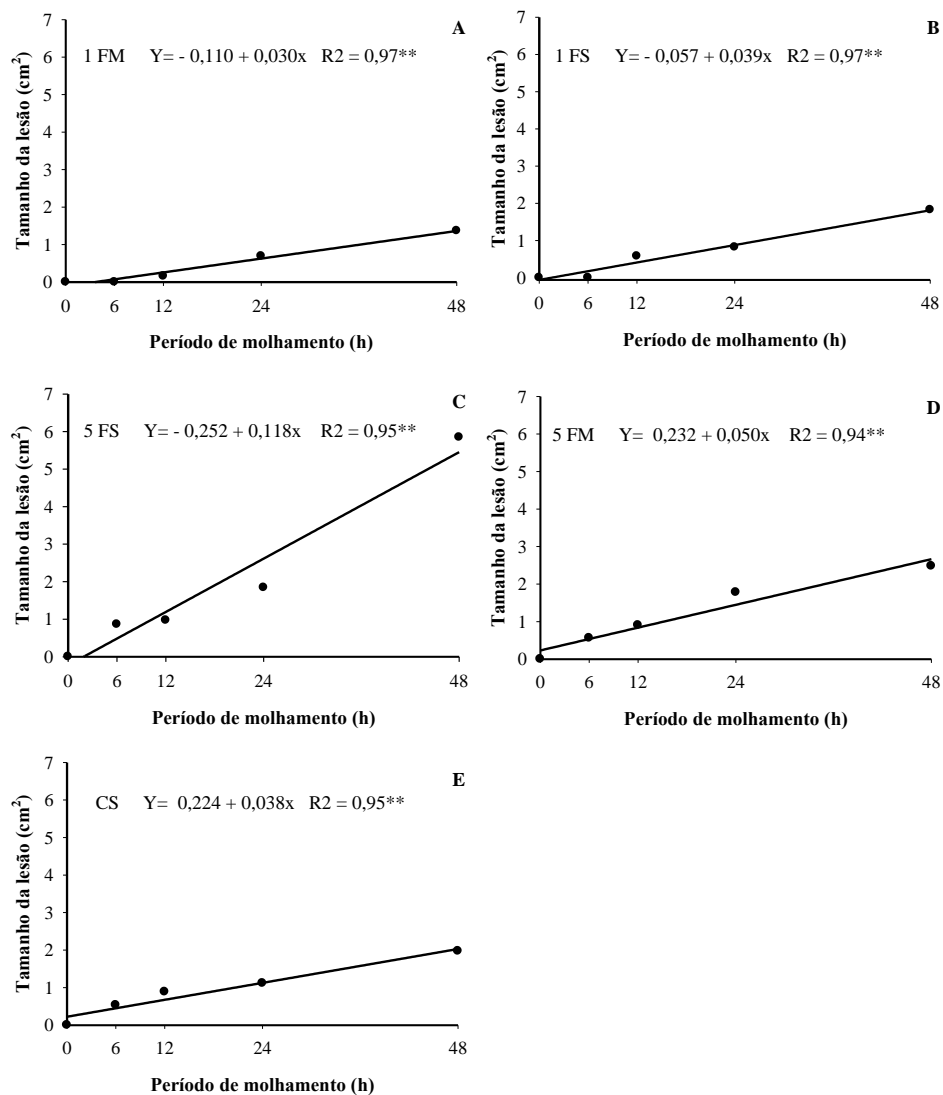


Gráfico 2 Tamanho da lesão em bananas causada por *Colletotrichum musae* sob diferentes períodos de molhamento (0, 6, 12, 24, e 48 h) e métodos de inoculação, um furo com micélio '1FM' (A), um furo com suspensão '1FM' (B), cinco furos com suspensão '5FS' (C), cinco furos com micélio '5FM' (D) e corte com suspensão 'CS' (E). ** significativo ($p \leq 0,01$). CV(%)= 9,20

O período de molhamento de 6 h, associado com os métodos de inoculação 1FM e 1FS, não ocasionaram doença nas frutas (Gráficos 2A e 2B). Também com 0 h de molhamento, não houve desenvolvimento de lesões em bananas em todos os métodos de inoculação testados (Gráficos 2A, 2B, 2C, 2D e 2E), indicando a necessidade de umidade na área superficial das frutas. Resultados semelhantes foram observados por Uchôa et al. (2012), ao constatarem que não houve incidência de doença em bananeira submetidas a 0 h de molhamento. Em contrapartida, Silveira et al. (2001) verificaram que o molhamento foi desnecessário para ocasionar incidência de podridões pós-colheita em tomate causadas por *Fusarium verticillioides* e *Geotrichum candidum*. Esses autores observaram, ainda, em tomates com 0 h de molhamento, 100% de incidência de podridões ocasionadas por *Rhizopus stolonifer*. Oliveira et al. (2014a) observaram presença de lesões ocasionadas por *F. semitectum* em frutos de melão, com e sem molhamento, porém, sobre umidade de 48 h o tamanho das lesões foi mais expressivo

A alta umidade relativa auxilia na manutenção da turgidez das frutas e frutos frescos. Além disso, é um dos fatores que mais favorece o incremento de doenças pós-colheita, em função da quantidade de gotículas que se acumulam na superfície das frutas e frutos, criando microclima favorável para o surgimento da doença (OLIVEIRA et al., 2014a). Portanto, algumas medidas podem ser adotadas, para reduzir os riscos de doenças pós-colheita, tais como: evitar umidade elevada sob a superfície das frutas que, normalmente, é ocasionada por irrigações prolongadas, realizar desbaste de restos florais e frutas sintomáticas visando reduzir o inóculo de *C. musae* na área, implantação de cultivares resistentes, boas práticas de manejo cultural, lavagem e embalagem cuidadosa das frutas visando evitar fermentos (CORDEIRO; MATOS; KIMATI, 2005). Estudos com esse propósito são necessários para explicar melhor a epidemiologia da doença e contribuir para uma produção mais significativa.

4 CONCLUSÕES

A filogenia individual das regiões gênicas GAPDH e ACT permite o agrupamento do isolado obtido de banana dentro do complexo de espécies *Colletrotrichum gloeosporiodes*.

A análise filogenética da combinação das regiões GAPDH e ACT classifica o isolado de banana como *Colletrotrichum musae* com alto suporte.

O método de inoculação cinco furos, com suspensão combinado com 48 h de molhamento, proporciona maior desenvolvimento de lesões em bananas.

REFERÊNCIAS

- AQUINO, C. F. et al. Ação e caracterização química de óleos essenciais no manejo da antracnose do maracujá. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 34, n. 4, p. 1059-1067, Dez. 2012.
- BRASIL. Ministério da Integração Nacional. **Banana, 2000**. Brasília, 2008. Disponível em: <<http://www.integração.gov.br>>. Acesso em: 8 jun. 2008.
- BASTOS, C. N.; ALBUQUERQUE, P. S. B. Efeito do óleo de *Piper aduncum* no controle em pós-colheita de *Colletotrichum musae* em banana. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 5, p. 555-557, 2004.
- BOTREL, N. et al. Inibição do amadurecimento de banana-'Prata-Anã' com a aplicação do 1-Metilciclopropeno. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 1, p. 53-56, 2002.
- CARBONE, I.; KOHN, L. M. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. **Mycologia**, Lawrence, v.91, n. 3, p. 553-556, 1999.
- CORDEIRO, Z. J. M.; MATOS, A. P.; KIMATI, H. Doenças da bananeira. In: KIMATI, H. et al. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Ceres, 2005. v. 2, p. 99-117.
- DENARDI, F.; BERTON, O.; SPENGLER, M. M. Resistência genética à podridão-amarga em maçãs, determinada pela taxa de desenvolvimento da doença em frutos com e sem ferimentos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 3, p. 494-497, 2003.
- FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, Lavras, v. 6, n. 2, p. 36-41, 2008.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Produção de banana, 2013**. Disponível em: <<http://www.fao.org/>>. Acesso em: 10 fev. 2016.

GAÑÁN, L.; ÁLVAREZ, E.; CASTAÑO-ZAPATA, J. Identificación genética de aislamientos de *Colletotrichum* spp. causantes de antracnosis en frutos de aguacate, banano, mango y tomate de árbol. **Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales**, Colômbia, v. 39, n. 152, p. 339-347, julio/sep. 2015.

MAQBOOL, M.; ALI, A.; ALDERSON, P. G. A combination of gum arabic and chitosan can control anthracnose caused by *Colletotrichum musae* and enhance the shelf-life of banana fruit. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, London, v. 85, n. 5, p. 432-436, Nov. 2010.

MORAES, W. S.; ZAMBOLIM, L.; LIMA, J. D. Incidência de fungos em pós-colheita de banana 'Prata anã' (Musa AAB). **Summa phytopatológica**, Botucatu, v. 32, n. 1, p. 67-70, 2006.

NERY-SILVA, F. A. et al. Metodologia de inoculação de fungos causadores da podridão peduncular em mamão. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 5, p. 1374-1379, 2007.

OLIVEIRA, T. A. S. et al. Efeito do estágio de maturação, tipo de inóculo e local de inoculação na severidade da podridão peduncular em manga. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 33, n. 6, p. 409-414, nov./dez. 2008.

OLIVEIRA, M. J. D. et al. Effects of wounding, humidity, temperature, and inoculum concentrations on the severity of corky dry rot caused by *Fusarium semitectum* in melon fruits. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 36, n. 3, p. 281-289, july/sep. 2014a.

OLIVEIRA, T. A. S. et al. Fatores epidemiológicos de *Phytophthora palmivora* afetando a severidade da podridão-dos-frutos do mamoeiro na pós-colheita. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 40, n. 3, p. 256-263, Set. 2014b.

PESSOA, W. R. L. S. et al. 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.

PRIHASTUTI, H. et al. Characterization of *Colletotrichum* species associated with coffee berries in northern Thailand. **Fungal Diversity**, Chiang Rai, v. 39, p. 89-109, Dec. 2009.

SANTOS, J. P. et al. Incidência de podridão-branca em frutos de macieira com e sem fermentos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 1, p. 118-121, Março 2008.

SENHOR, R. F. et al. Influência do método de inoculação, intensidade do ferimento e idade do fruto na severidade da podridão-de-cratera em melão. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 34, n. 3, p. 232-237, julho/set. 2008.

SILVEIRA, N. S. S. et al. Influência da temperatura, período de molhamento e concentração do inóculo de fungos na incidência de podridões pós-colheita em frutos de tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 1, p. 33, 2001.

SIVIERO, A. et al. Avaliação de métodos de inoculação de *Phytophthora parasitica* em plântulas e plantas jovens de citros. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 6, p. 574-580, 2002.

SOARES, A. R.; LOURENÇO, S. A.; AMORIM, L. Infecção de goiabas por *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum acutatum* sob diferentes temperaturas e períodos de molhamento. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 33, n. 4, p. 265-272, jul./ago. 2008.

TAMURA, K. et al. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 28, n. 10, p. 2731-2739, May. 2011.

TEMPLETON, M. D. et al. Cloning and molecular characterization of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-encoding gene and cDNA from the plant pathogenic fungus *Glomerella cingulata*. **Gene**, New York, v. 122, n. 1, p. 225-230, Dec. 1992.

UCHÔA, C. N. et al. Relação entre a temperatura e o molhamento foliar no monociclo da sigatoka-negra. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 38, n. 2, p.144-147, Fev. 2012.

WEIR, B. S.; JOHNSTON, P. R.; DAMM, U. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 73, n.1, p.115-180, Aug. 2012.

CAPÍTULO 3

PELÍCULA À BASE DE FÉCULA DE MANDIOCA E ÓLEOS ESSENCIAIS NO CONTROLE DA ANTRACNOSE EM BANANAS

RESUMO

A banana é uma das frutas mais consumidas mundialmente. A produção dessa fruta é afetada por doenças pós-colheita entre elas a antracnose. Em função da busca por produtos alternativos de controle para antracnose, objetivou-se, com este trabalho, avaliar o potencial *in vitro* e *in vivo* de película à base de fécula de mandioca nas concentrações 2 e 3% e óleos essenciais no controle da antracnose em bananas. Foram utilizados os óleos essenciais de cravo-da-índia, tomilho, capim-limão, canela e orégano, na concentração 0,1%, selecionada por meio de ensaio preliminar *in vitro*. Nos experimentos *in vitro*, foram avaliados o crescimento micelial e a germinação de conídios de *Colletotrichum musae* com as películas 2 e 3% combinadas ou não aos óleos essenciais. *In vivo* foram realizados experimentos curativo e preventivo, no experimento curativo as frutas foram inicialmente inoculadas em quatro pontos distintos com suspensão ajustada para 2×10^6 e, após 48 h de molhamento, foram revestidas com as películas combinadas ou não com os óleos essenciais e secadas por 12 h; já, para o experimento preventivo, as frutas foram revestidas e secas por 12 h antes da inoculação. *In vitro* o crescimento micelial foi avaliado, diariamente, por meio de medições das colônias em dois sentidos opostos com paquímetro digital e a germinação foi calculada pela porcentagem de conídios germinados. Nos experimentos *in vivo*, os tamanhos das lesões foram calculados por meio de medições com paquímetro digital realizadas diariamente em dois sentidos opostos. No último dia de avaliação, foram coletadas amostras da área lesionada da casca das frutas para análise em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV). Verificou-se inibição total do crescimento micelial e da germinação de conídios com o óleo de orégano. As películas 2 e 3%, combinadas ou não com os óleos de capim-limão e tomilho, bem como esses óleos isolados, proporcionaram as frutas tratadas de forma curativa e preventiva menores tamanhos das lesões de antracnose. Nas imagens por MEV, observaram-se alterações ultraestruturais no patógeno promovidas pela ação das películas e dos óleos essenciais.

Palavras-chave: Fruta. *Colletotrichum musae*. Patologia pós-colheita. Produtos alternativos.

ABSTRACT

The banana is one of the most consumed fruits worldwide. The fruit production is affected by postharvest diseases, such as anthracnose. In order to find alternative products to control the anthracnose, we aimed in this work to evaluate the *in vitro* and *in vivo* potential control of anthracnose in bananas by film of cassava starch at the concentrations 2 and 3% and by essential oils. The essential oils of clove, thyme, lemon grass, cinnamon and oregano were used at the concentration 0.1%, selected in a previous *in vitro* assay. For the *in vitro* assay, the mycelial growth and spore germination of *Colletotrichum musae* were evaluated after being treated with films 2 and 3% combined or not with the essential oils. For the *in vivo* test, a curative and a preventive experiment were performed, and in the curative experiment fruits were initially inoculated into four different points with suspension 2×10^6 , and after 48 h of wetting, the fruits were coated with the films combined or not with essential oils and dried for 12 h. Regarding the preventive experiment, the fruit was previously coated and dried for 12 h before inoculation. Mycelial growth was evaluated daily by measuring the colonies in two opposite directions with a digital caliper, and germination was calculated by conidia percentage. Regarding the *in vivo* experiments, the lesion sizes were measured daily by a digital caliper in two opposite directions. On the last evaluation day, samples were collected from the injured area of the fruit peel to be analysed with a Scanning Electron Microscope (SEM). There was a total inhibition of mycelial growth and spore germination for the oregano oil. The films at 2 and 3%, combined or not with essential oils of lemon grass or thyme, as well as these isolated oils, showed treated fruit with smaller sizes of anthracnose lesions with both curative and preventive methods. Ultrastructural changes in the pathogen were observed by SEM images, which were promoted by the film effects and by essential oils.

Keywords: Fruit. *Colletotrichum musae*. Postharvest pathology. Alternative products.

1 INTRODUÇÃO

A banana (*Musa* spp.) é considerada a segunda fruta mais consumida no mundo, em função do alto teor de vitaminas, sais minerais, carboidratos e gorduras, o que faz dela parte integrante da alimentação (COSTA; ERABADUPITIYA, 2005). De acordo com os dados da FAO (2016), a produção mundial de banana, em 2013, foi de 106 milhões de toneladas. Apesar disso, ressalta-se o grande desafio para produzir com qualidade, sem contrair os planos de políticas públicas que garantam a segurança dos alimentos. E, para atender a esses requisitos, é necessário produzir de maneira sustentável e controlar as doenças em bananas causadas, principalmente, por fungos que são responsáveis por consideráveis perdas na pós-colheita.

Entre as doenças pós-colheita da banana, destaca-se a antracnose, causada pelo agente etiológico *Colletotrichum musae*, responsável por perdas em torno de 30 a 40% (MAQBOOL; ALI; ALDERSON, 2010a). Em função disso, diversas medidas de controle têm sido recomendadas, incluindo métodos culturais e químicos. Existem algumas desvantagens quanto ao uso de fungicidas, como ocorrência de fitotoxicidade, efeitos residuais ao ambiente e resistência a patógenos (BASTOS; ALBUQUERQUE, 2004).

A utilização de compostos orgânicos naturais como extratos vegetais, óleos essenciais e películas biodegradáveis, à base de fécula de mandioca, constituem alternativas mais viáveis e sustentáveis para inibição do desenvolvimento de fungos do gênero *Colletotrichum*. Entre esses produtos a película à base de fécula de mandioca já teve efeito comprovado em muitos trabalhos sendo recomendada como fonte promissora de controle (OLIVEIRA, 2013; ORIANI et al., 2014; ROZWALKA, 2010).

Diversas pesquisas confirmam a potencialidade dos óleos essenciais como agentes inibitórios de vários fitopatógenos (BOSQUEZ-MOLINA et al.,

2010; ROZWALKA et al., 2008), sendo muitos deles extraídos de diversas partes das plantas medicinais, não causando nenhum efeito tóxico ao homem nas concentrações utilizadas. Dessa forma, tornam-se viáveis estudos que evidenciem o uso de produtos naturais no controle de doenças pós-colheita. Além disso, o conhecimento sobre a ação dos óleos essenciais, associados com película à base de fécula de mandioca, pode contribuir para o desenvolvimento de estratégias mais promissoras, as quais visem, futuramente, reduzir os custos de produção e estimular o consumo de frutas mais atrativas.

Diante do exposto, objetivou-se, com este trabalho, verificar o potencial *in vitro* e *in vivo* da película à base de fécula de mandioca e óleos essenciais no controle do fungo *Colletotrichum musae* agente causal da antracnose em banana.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos *in vitro* e *in vivo* foram realizados no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA). As análises da composição química dos óleos essenciais foram feitas na Central de Análise e Prospecção Química (CAPQ) do Departamento de Química da mesma instituição.

2.1 Seleção, obtenção e concentração dos óleos essenciais

Os óleos essenciais foram escolhidos, mediante o potencial de inibição ao patógeno em trabalhos *in vitro* e *in vivo* em frutos de mamão e goiaba descritos por Oliveira (2013) e Rozwalka (2010), respectivamente. Os óleos foram adquiridos da empresa Quinari (Ponta Grossa - PR) e são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 Óleos essenciais selecionados para o estudo e a parte da planta de onde foram extraídos

Nome científico	Nome comum (local da planta)
<i>Eugenia caryophyllata</i>	Cravo-da-índia (botão)
<i>Thymus vulgaris</i>	Tomilho (folhas)
<i>Cymbopogon citratus</i>	Capim-limão (folhas)
<i>Cinnamomum zeylanicum.</i>	Canela (cascas)
<i>Origanum vulgare</i>	Orégano (folhas)

A concentração dos óleos essenciais foi selecionada por meio de ensaio preliminar *in vitro*, realizado em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 5 x 5, cinco óleos essenciais (cravo-da-índia, tomilho, capim-

limão, canela e orégano), combinados com cinco diferentes concentrações (0,00, 0,02, 0,04, 0,08 e 0,10%), totalizando 25 tratamentos com quatro repetições e uma placa por parcela.

Para cada tratamento, preparou-se uma solução de 5 mL, utilizando água destilada e esterilizada com Tween 20 a 0,7%, surfactante com função dispersante para misturar e solubilizar o óleo. Para obtenção das concentrações finais de 0,00, 0,02, 0,04, 0,08 e 0,10%, foram adicionados nas soluções 0, 1, 2, 4 e 5 µL dos óleos essenciais, respectivamente.

Em câmara de fluxo laminar, foi acrescentado 1 mL da solução de cada concentração em 9 mL de meio malte fundente, resfriado até 45 °C e vertido nas placas. Após solidificação do meio, transferiu-se um disco de 5 mm de diâmetro da cultura monospórica de código ABA20 para o centro de cada placa. Foi utilizada uma testemunha com Tween 20 a 0,7%, para isolar o seu efeito e um controle positivo com o fungicida Tecto SC na concentração recomendada pelo fabricante (0,65 mL/L). Em seguida, as placas foram vedadas com papel filme e incubadas em BOD, a 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 h.

As avaliações foram realizadas, diariamente, durante oito dias, medindo-se com paquímetro digital o diâmetro das colônias em dois sentidos opostos. O índice de crescimento micelial (IVCM) foi calculado pela fórmula proposta por Maguire (1962) e adaptada por Oliveira (1991): $IVCM = S (D - D_a) / N$.

Em que, IVCM= índice de velocidade de crescimento micelial; S= somatório; D= diâmetro médio atual; D_a = diâmetro médio do dia anterior e N= número de dias após inoculação.

Os dados foram submetidos à análise de variância, houve interação significativa entre as variáveis, e as concentrações foram submetidas ao ajuste de modelos utilizando o programa Sisvar (FERREIRA, 2008). Após o ajuste de modelos lineares, a concentração 0,1% apresentou maior inibição do patógeno, sendo escolhida para realização dos experimentos *in vitro* e *in vivo* (gráfico 1).

2.2 Composição química dos óleos essenciais

As avaliações qualitativas dos óleos essenciais foram realizadas por cromatografia gasosa, acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), em equipamento Shimadzu, modelo QP2010 plus. O equipamento foi operado nas seguintes condições experimentais: coluna capilar de sílica fundida (30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno), com fase ligada SLBTM (0,25 µm de espessura de filme), vazão do gás Hélio, no fluxo de 1,18 mL/min, o injetor e detector operaram nas temperaturas de 200 e 240 °C, respectivamente. A programação inicial de temperatura da coluna foi de 60 °C, com rampa de aquecimento de 3,0 °C/min até atingir 240 °C e mais 10 °C/min até atingir 300 °C, permanecendo por 7 min, com um tempo de corte de 3,0 min. As amostras de cada óleo foram diluídas em hexano, na concentração 1% v/v e injetado, automaticamente, no cromatógrafo, utilizando volume de injeção de 1,0 µL, no modo split com uma razão de 1:100. O tempo total para a realização das análises foi de 73 min. Para o espectrômetro de massas (EM), foram utilizadas as seguintes condições: energia de impacto eletrônico de varredura: 70 eV; velocidade de decomposição: 1,0 ponto/s; intervalo de decomposição: 0,50 fragmentos e fragmentos decompostos em 45 e 450 m/Z. Uma série homóloga de padrões de n-alcenos (nC8-nC25) foi injetada nas mesmas condições das amostras. Os picos obtidos foram comparados com o banco de dados das bibliotecas Wiley 8 e FFNSC 1.2, e os índices de retenção dos compostos relativos à coinjeção da série de n-alcenos foram calculados pelo método de Dool e Kratz (1963).

Nas análises quantitativas, foi utilizado um cromatógrafo gasoso Shimadzu GC-2010, 17 A, acoplado com detector por ionização de chama (DIC), equipado com uma coluna capilar RTX (30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno x 0,25 µm de espessura do filme), o gás Hélio foi

utilizado como arraste no fluxo de 1,18 mL/min, as temperaturas do injetor e do detector foram mantidas em 220 e 240 °C, respectivamente. As condições da coluna e a quantidade de injeção foram as mesmas descritas anteriormente. Os resultados, para cada composto, foram obtidos por meio da normalização de áreas dos picos (%).

2.3 Aquisição da fécula de mandioca e do fungicida

A fécula de mandioca e o fungicida Tecto SC, cujo ingrediente ativo é o thiabendazol, foram adquiridos em comércio local.

2.4 Tratamentos *in vitro*

Os tratamentos testados *in vitro* foram:

- a) meio malte puro (controle 1);
- b) tween 20; (controle 2);
- c) fungicida Tecto SC (controle 3);
- d) película à base de fécula de mandioca 2%;
- e) película à base de fécula de mandioca 3%;
- f) película à base de fécula de mandioca 2% associada ao óleo essencial de cravo-da-índia a 0,1%;
- g) película à base de fécula de mandioca 3% associada ao óleo essencial de cravo-da-índia a 0,1%;
- h) película à base de fécula de mandioca 2% associada ao óleo essencial de tomilho a 0,1%;
- i) película à base de fécula de mandioca 3% associada ao óleo essencial de tomilho a 0,1%;

- j) película à base de fécula de mandioca 2% associada ao óleo essencial de capim-limão a 0,1%;
- k) película à base de fécula de mandioca 3% associada ao óleo essencial de capim-limão a 0,1%;
- l) película à base de fécula de mandioca 2% associada ao óleo essencial de canela a 0,1%;
- m) película à base de fécula de mandioca 3% associada ao óleo essencial de canela a 0,1%;
- n) película à base de fécula de mandioca 2% associada ao óleo essencial de orégano a 0,1%;
- o) película à base de fécula de mandioca 3% associada ao óleo essencial de orégano a 0,1%;
- p) óleo essencial de cravo-da-índia a 0,1%;
- q) óleo essencial de tomilho a 0,1%;
- r) óleo essencial de capim-limão a 0,1%;
- s) óleo essencial de canela a 0,1%;
- t) óleo essencial de orégano a 0,1%.

2.5 Avaliação *in vitro* de película à base de fécula de mandioca e óleos essenciais na inibição do crescimento micelial e germinação de conídios de *Colletotrichum musae*

Todos os tratamentos descritos anteriormente foram preparados em condições assépticas, utilizando câmara de fluxo laminar.

Para o teste de inibição do crescimento micelial, foram utilizados como controles o meio malte puro (20 g de extrato de malte e 20 g de ágar para 1 L de água), Tween 20 (0,7% em 5 mL de água destilada e esterilizada) e o fungicida Tecto SC (0,65 mL/L), respectivamente. Para obtenção do tratamento (controle

1), foram utilizados 10 mL do meio malte puro; para o tratamento (controle 2), foi acrescentado 1 mL de Tween 20 em 9 mL de meio malte fundente; e para o tratamento (controle 3), foi acrescentado 1 mL de fungicida Tecto SC em 9 mL de meio malte fundente e vertidos em placas estéreis de 9 cm de diâmetro.

Nos tratamentos, contendo associação ou não de película com óleo essencial, a fécula de mandioca foi autoclavada e preparada nas concentrações 2 e 3% (peso/volume), sendo aquecida em micro-ondas até 90 °C e agitada periodicamente de 10 em 10 s, para obtenção das películas sem grânulos. Nas placas com meio malte já solidificado, contendo ou não óleos essenciais, conforme o tratamento, foi adicionado 1 mL das películas 2 e 3% sobre a superfície do meio e espalhadas com auxílio da alça de Drigalsky.

Para os tratamento contendo apenas os óleos essenciais na concentração 0,1%, foram preparadas soluções de 5 mL contendo água destilada, Tween 20 a 0,7% e 5 µL de cada óleo. Dessas soluções foi retirado 1 mL e acrescentado em 9 mL do meio malte fundente resfriado até 45 °C e vertido em placas.

Após a solidificação do meio, discos de micélio de 5 mm de diâmetro, retirados da cultura monospórica de código ABA20, foram transferidos para o centro das placas, em seguida, as mesmas foram vedadas com papel filme e incubadas em BOD, a 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 h. O crescimento micelial foi avaliado diariamente durante oito dias medindo-se com paquímetro digital o diâmetro das colônias em dois sentidos opostos. O índice de crescimento micelial (IVCM) foi calculado pela fórmula $IVCM = S (D-Da) / N$, proposta por Maguire (1962), adaptada por Oliveira (1991).

Para o teste de germinação, foram utilizados os mesmos tratamentos anteriormente descritos no item 2.4, as únicas diferenças foram em relação à troca do meio malte pelo meio ágar-água (20 g para 1L de água) e do disco de micélio pela suspensão de conídios. A suspensão de conídios de *C. musae* foi obtida com a cultura monospórica de código ABA20, adicionando-se 20 mL de

água destilada esterilizada na placa e raspagem com lâmina de vidro estéril. Após remoção da massa micelial, foi feita a filtração do conteúdo em gaze esterilizada. A concentração foi ajustada para 2×10^6 conídios/mL com auxílio de um hemacitômetro. Foram utilizadas placas de Petri de 9 cm de diâmetro, com 9 mL de meio ágar-água fundente e 1 mL dos tratamentos preparados da mesma maneira apresentada anteriormente no teste de inibição do crescimento micelial. Alíquotas de 100 μ L da suspensão foram adicionadas nas placas com meio já solidificado e espalhadas com auxílio da alça de Drigalsky. Depois as placas foram vedadas com papel filme e incubadas em BOD a 25 °C, com fotoperíodo de 12 h.

Após 12 h, tempo suficiente para a germinação, as placas foram retiradas da BOD e a germinação dos conídios foi paralisada utilizando duas gotas do corante azul de algodão com lactoglicerol. Em seguida, foi feita a contagem dos conídios germinados em microscópio de luz com aumento de 10 vezes. Para cada repetição, foram contados 100 conídios em dois quadrantes da placa, totalizando 400 conídios por tratamento. Considerou-se conídio germinado aquele que apresentou o comprimento do tubo germinativo maior ou igual ao diâmetro do conídio. Com o número total de conídios contados (germinados e não germinados), estimou-se a percentagem de conídios germinados.

Os experimentos de crescimento micelial e germinação de conídios foram conduzidos duas vezes em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições. Os dados dos experimentos foram analisados conjuntamente, e a magnitude dos erros experimentais foi semelhante confirmando a consistência das observações. Os dados foram submetidos às pressuposições da ANOVA, utilizando o software R, e posteriormente à análise de variância. As variáveis significativas no teste F ($p \leq 0,05$) foram comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade, utilizando o software Sisvar.

3 Experimento *in vivo* preventivo e curativo

3.1 Aquisição e preparo das frutas

Bananas 'Prata' foram adquiridas no Sítio Vale dos Ventos, localizado no município de Lavras - MG. Posteriormente, foram selecionadas apenas frutas assintomáticas sem dano mecânico e submetidos à lavagem, desinfestadas em hipoclorito de sódio a 2%, durante 3 min, lavadas em água destilada e secas em papel toalha. Foram utilizadas frutas em estágio de maturação 3 e frutas totalmente verdes Brasil (2008), sem receber nenhum tratamento, para a realização dos experimentos curativo e preventivo, respectivamente.

3.2 Preparo do inóculo e inoculação das frutas

O isolado de código ABA20 incorporado na coleção micológica e identificado no capítulo anterior como *C. musae* foi utilizado para o inóculo.

Após oito dias de cultivo de *C. musae*, em meio malte, foram adicionados 20 mL de água destilada e esterilizada na placa e espalhada, com auxílio de uma alça de Drigalsky, por toda a colônia para desprender as estruturas do fungo. Posteriormente, a suspensão foi filtrada em gaze e ajustada para 2×10^6 conídios/mL, utilizando hemacitômetro.

Bananas foram inoculadas pelo método de inoculação cinco furos com suspensão selecionado com base nos resultados obtidos no capítulo 2, em quatro pontos distintos da região mediana das frutas. Com auxílio de pipeta automática, foram depositados, em cada ponto, 20 μ L da suspensão na concentração 2×10^6 conídios/mL. Em seguida, as frutas foram envolvidas por sacos plásticos, formando câmara úmida com temperatura de 25 ± 2 °C e umidade média relativa de $90 \pm 5\%$, durante 48 h de molhamento (selecionado, também, com base nos

resultados do capítulo 2). Após a retirada dos sacos plásticos, as bananas permaneceram em bancada por 12 h para secagem, sobre temperatura de 26 ± 2 °C e umidade média relativa de $60 \pm 5\%$. No experimento preventivo, as bananas foram inicialmente tratadas secas por 12 h e depois submetidas à inoculação seguindo esse mesmo processo.

3.3 Tratamentos curativos e preventivos

Foram testados de forma curativa e preventiva os tratamentos:

- a) frutas imersas apenas em água destilada (controle 1);
- b) frutas imersas somente em Tween 20 a 0,7% (controle 2);
- c) frutas imersas somente em Tecto SC (controle 3);
- d) frutas revestidas com película à base de fécula de mandioca 2%;
- e) frutas revestidas com película à base de fécula de mandioca 3%;
- f) frutas revestidas com película à base de fécula de mandioca 2%, combinada com óleo de cravo-da índia a 0,1%;
- g) frutas revestidas com película à base de fécula de mandioca 3%, combinada com óleo de cravo-da-índia a 0,1%;
- h) frutas revestidas com película à base de fécula de mandioca 2%, combinada com óleo de tomilho a 0,1%;
- i) frutas revestidas com película à base de fécula de mandioca 3%, combinada com óleo de tomilho a 0,1%;
- j) frutas revestidas com película à base de fécula de mandioca 2%, combinada com óleo de capim-limão a 0,1%;
- k) frutas revestidas com película à base de fécula de mandioca 3%, combinada com óleo de capim-limão a 0,1%;
- l) frutas revestidas com película à base de fécula de mandioca 2%, combinada com óleo de canela a 0,1%;

- m) frutas revestidas com película à base de fécula de mandioca 3%, combinada com óleo de canela a 0,1%;
- n) frutas revestidas com película à base de fécula de mandioca 2%, combinada com óleo de orégano a 0,1%;
- o) frutas revestidas com película à base de fécula de mandioca 3%, combinada com óleo de orégano a 0,1%;
- p) frutas revestidas apenas com óleo essencial de cravo-da-índia a 0,1%;
- q) frutas revestidas apenas com óleo essencial de tomilho a 0,1%;
- r) frutas revestidas apenas com óleo essencial de capim-limão a 0,1%;
- s) frutas revestidas apenas com óleo essencial de canela a 0,1%;
- t) frutas revestidas apenas com óleo essencial de orégano a 0,1%.

3.4 Preparo das soluções para o revestimento das frutas

O preparo dos tratamentos seguiu a mesma metodologia para os experimentos curativo e preventivo.

Foram utilizados como controles água destilada (controle 1), Tween 20 (controle 2) e fungicida Tecto SC (controle 3). No controle 1, as bananas foram imersas em 800 mL de água destilada; no controle 2, em água destilada (800 mL) mais Tween 20 a 0,7%; e, no controle 3, em calda do fungicida preparada na concentração de 0,65 mL/L, utilizada em pós-colheita de bananas.

Para a imersão de bananas nas películas combinadas ou não com óleos essenciais, as suspensões de féculas de mandioca foram preparadas para 800 mL de água destilada e ajustadas nas concentrações 2 e 3%. Posteriormente foram aquecidas em micro-ondas a 90 °C, agitadas de 10 em 10 s, para obtenção de géis sem grânulos. Após o resfriamento dos géis, os óleos essenciais, na concentração de 0,1% diluídos em Tween 20 a 0,7%, foram incorporados às

películas 2 e 3% com auxílio de pipeta automática, seguida da agitação com bastão de vidro.

Imersão de bananas apenas em soluções com óleos essenciais a 0,1%, foram adicionados 800 μL de cada óleo essencial em béqueres, contendo 793,6 mL de água destilada mais Tween 20 na concentração de 0,7%. Depois as soluções foram agitadas com bastão de vidro.

3.5 Recobrimento das frutas tratadas de forma curativa e preventiva

Para os experimentos curativo e preventivo, bananas foram revestidas pela imersão das frutas nas soluções correspondentes a cada tratamento, durante 1 min e retiradas por 3 min para secagem; esse processo foi repetido três vezes.

As frutas tratadas foram colocadas em suportes plásticos, identificados com seus respectivos tratamentos e colocadas sobre bancada no laboratório, visando reproduzir as condições de comercialização, com temperatura de 25 ± 2 °C e umidade média relativa de $60 \pm 5\%$.

3.6 Delineamento experimental e avaliações

Os experimentos foram realizados em delineamento inteiramente casualizado, com 20 tratamentos, quatro repetições e uma fruta por parcela.

As avaliações foram realizadas diariamente, por meio de medições com auxílio de paquímetro digital, medindo-se as lesões em dois sentidos perpendiculares. Em seguida, foi calculada a área média lesionada em cm^2 nos pontos inoculados. Utilizou-se a fórmula para cálculo da área do círculo: $A = \pi r^2$.

Em que A = área lesionada; π = constante com valor (3,1416) e r = raio médio da lesão.

No final das avaliações, que duraram oito dias para o experimento curativo e dez dias para o preventivo, as frutas dos melhores tratamentos de ambos os experimentos permaneceram em bancada nas mesmas condições descritas anteriormente, para avaliar a sua longevidade.

Os dados obtidos nos experimentos preventivo e curativo foram analisados quanto às pressuposições da análise de variância, utilizando o software R e submetidos à análise de variância utilizando software Sisvar. As variáveis significativas no teste F ($p \leq 0,05$) foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

3.7 Coletas e preparo das amostras provenientes de bananas para microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As amostras das frutas, selecionadas para análise em microscópio eletrônico de varredura (MEV), foram coletadas, após o final de cada experimento, por meio de cortes de 5 mm de diâmetro realizados com bisturi nos pontos inoculados. Os fragmentos foram colocados em Eppendorf, contendo 1,0 mL de fixador Karnovsky's, por um período mínimo de 24 h, seguida da pós-fixação em tetróxido de ósmio (OsO_4) a 2%. Após 1 h, as amostras foram lavadas em água destilada três vezes e submetidas à desidratação em série crescente de acetona nas concentrações de 25, 50, 75, 90 e 100%. Após a desidratação, as amostras foram levadas ao ponto crítico BAL-TEC CPD 030 para a substituição da acetona por CO_2 . Os espécimes obtidos foram fixados com fita dupla-face de carbono em suportes metálicos, revestidos com papel alumínio, cobertos com ouro no evaporador BAL-TEC 050 e armazenados em dessecador contendo sílica gel para a observação em MEV LEO Evo 40 XVP. As imagens das amostras foram geradas e registradas de forma digital, nas condições de trabalho de 20 Kv e distância de trabalho de 10 mm.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Seleção da concentração e composição química dos óleos essenciais

Houve interação significativa ($p \leq 0,05$) entre os óleos essenciais e concentrações.

Houve decréscimo linear no índice de velocidade de crescimento micelial de *Colletotrichum musae* à medida que aumentou as concentrações dos óleos essenciais. Em função desse motivo, adotou-se a concentração de 0,1% para todos os óleos essenciais, a qual proporcionou maior inibição do crescimento micelial do patógeno em todas as situações analisadas (Gráfico 1). Todos os óleos apresentaram uma excelente inibição na concentração de 0,1%, principalmente, o óleo de orégano no qual inibiu totalmente o crescimento micelial de *C. musae* (Gráfico 1D).

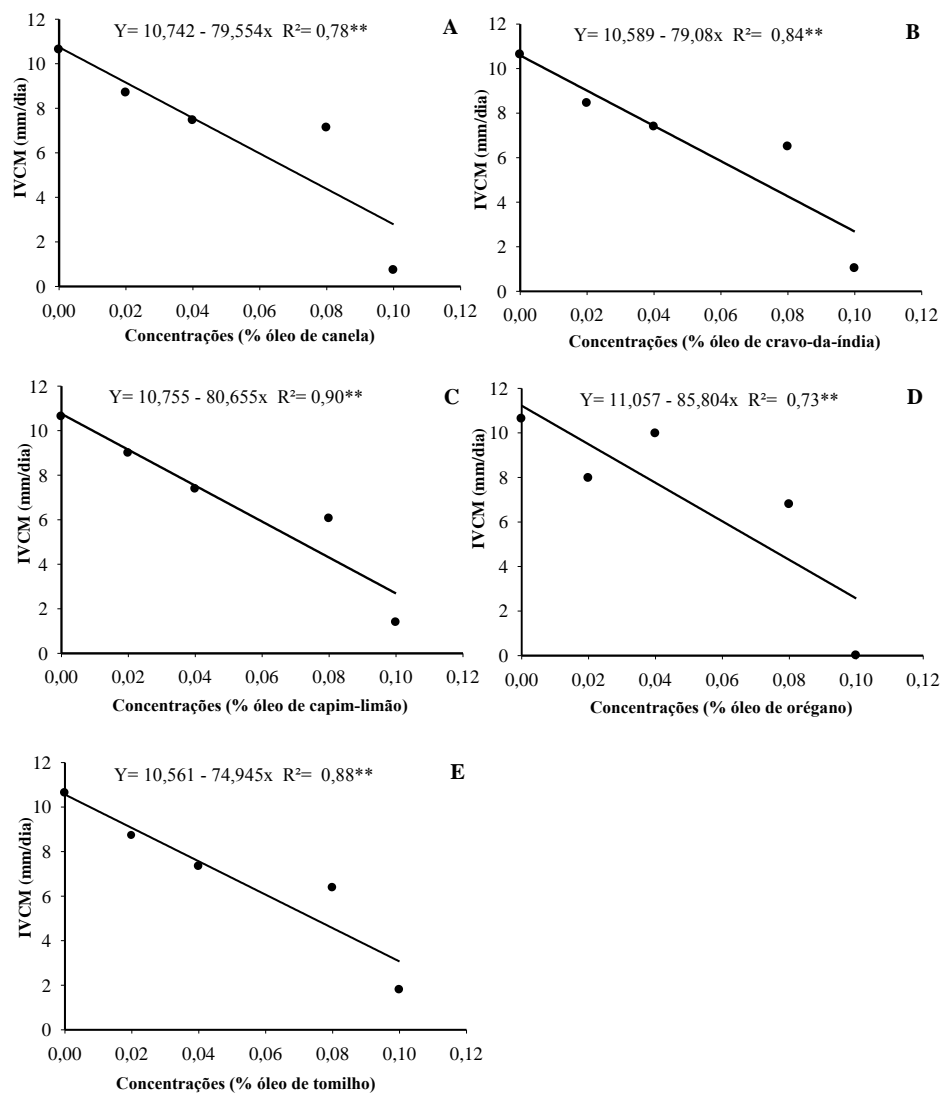


Gráfico 1 Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) de *Colletotrichum musae* sob o efeito dos óleos essenciais de canela (A), cravo-da-índia (B), capim-limão (C), orégano (D) e tomilho (E), submetidos a cinco diferentes concentrações (0,00, 0,02, 0,04, 0,08, 0,10%). ** significativo ($p \leq 0,01$). CV(%) = 2,82

Os compostos encontrados nos óleos essenciais de cravo-da-índia (OECI), canela (OECA), capim-limão (OECL), orégano (OEOR) e tomilho (OETO), com seus respectivos tempos de retenção, índices de retenção calculados e teores estão representados na Tabela 2.

Tabela 2 Composição química dos óleos essenciais de cravo-da-índia, canela, capim-limão, orégano e tomilho

Cravo-da-índia			
Compostos	TR	IR	Área (%)
Eugenol	22,77	1289	83,73
β -Cariofileno	25,46	1378	13,40
α -Humuleno	26,93	1383	1,51
Óxido de cariofileno	32,03	1383	1,19
α -Copaeno	23,62	1293	0,17
Total			100
Canela			
Compostos	TR	IR	Área (%)
<i>trans</i> -Cinamaldeído	19,38	1201	90,3
Eugenol	22,70	1289	8,45
Sabineno	26,93	1383	1,25
Total			100
Capim-limão			
Compostos	TR	IR	Área (%)
Geranial	19,06	1196	54,50
Neral	17,76	1193	36,87
Acetato de geranil	23,72	1288	1,68
Oxido de cariofileno	32,00	1392	1,26
Citronelilo formato	17,28	1190	1,13
Bergamal	13,45	1038	1,12
Citronelilo isobutirato	22,50	1204	0,25
Lavandulol	18,35	1193	0,24
β -Cariofileno	25,43	1293	0,23
Citronelal	13,98	1042	0,13
Germacreno D	29,25	1378	0,10
Total			97,75
Orégano			
Compostos	TR	IR	Área (%)
Carvacrol	20,58	1205	77,34
γ -Terpineno	10,20	1010	12,36
Linalol	11,85	1010	6,48
Mirceno	7,14	926	1,68

Tabela 2, conclusão

Compostos	TR	IR	Área (%)
Timol	20,18	1089	1,67
ρ -Cimeno	8,97	1000	0,27
Terpinoleno	8,69	998	0,20
Total			100
Tomilho			
Compostos	TR	IR	Área (%)
Timol	20,54	1279	26,84
ρ -Cimeno	8,97	995	24,04
Carvacrol	20,19	1278	21,97
α -Pineno	5,87	903	5,87
δ -3-Careno	6,15	907	3,54
4-Terpineol	15,29	1108	3,37
Linalol	11,85	1085	2,55
Limoneno	9,14	1000	2,04
Acetato de isobornila	19,83	1202	1,73
Borneol	14,95	1101	1,60
Eucaliptol	9,30	1001	1,45
Acetato de bornila	19,73	1184	0,75
Canfeno	13,89	1089	0,62
α -Terpineol	15,94	1110	0,58
Cânfora	6,63	980	0,53
Terpinoleno	11,28	1010	0,50
Mirceno	7,72	987	0,49
γ -Terpineno	10,20	1003	0,47
Sabineno	7,45	987	0,38
β -Ocimeno	8,44	994	0,30
α -Felandreno	8,34	989	0,26
α -Selineno	25,03	1280	0,12
Total			100

TR= tempo de retenção de cada composto, IR= índice de retenção dos compostos referente à série n-alcanos (nC8-nC25) em coluna DB-5, % = porcentagem do composto

No OECI foram identificados cinco compostos, sendo o eugenol (83,73%), β -cariofileno (13,40%) e α -humuleno (1,51%) os componentes majoritários (Tabela 2). Esses resultados foram similares aos obtidos por vários autores. Scherer et al. (2009) encontraram no óleo de cravo-da-índia, como componentes principais, eugenol (83,75%), β -cariofileno (10,98%), seguido por

α -humuleno (1,26%). Beraldo et al. (2013), Oliveira et al. (2009) e Snoussi et al. (2008), identificaram eugenol nos botões florais do cravo nos valores de 77,58, 88,38 e 88,58%, respectivamente. Da mesma forma, os compostos de eugenol, β -cariofileno e acetato de eugenol foram identificados nesse óleo nas quantidades de 90,3, 4,83 e 1,87%, respectivamente (SILVESTRI et al., 2010).

Os compostos mais abundantes, identificados no OECA, foram *trans*-cinamaldeído (90,3%) e eugenol (8,45%) (Tabela 2). Esses resultados estão de acordo com outros trabalhos realizados com o presente óleo. Pesquisas de Andrade et al. (2012) com óleo de canela verificaram a presença de 14 constituintes, sendo o *trans*-cinamaldeído (77,72%) encontrado como o principal componente seguido por acetato de cinamila (5,99%). No entanto, alguns estudos evidenciam como componente majoritário do óleo essencial extraído das cascas da canela o eugenol nas quantidades de 60 e 77,58% (BERALDO et al., 2013; LIMA et al., 2005) além do *trans*-cinamaldeído presente em 67,58% (BERALDO et al., 2013).

Os principais compostos identificados no OECL foram geranial (54,50%) e neral (36,87%) (Tabela 2). A mistura destes dois isômeros dá origem ao citral principal constituinte desse óleo (SOUSA et al., 1991). Vários autores afirmam a presença do citral em maiores quantidades no referido óleo. Oliveira et al. (2011) identificaram os componentes geranial e neral com 30,91 e 42,92%, respectivamente. Já Guimarães et al. (2008), analisando a composição química do óleo de capim-limão, encontraram como constituintes majoritários o geranial (37,42%), seguido do neral (31,89%) e mirceno (23,77%). Entretanto Castro et al. (2007) constataram nesse óleo os constituintes principais citronelal (36,67%), geraniol (25,67%) e citronelol (11,40%).

No OEOR foram identificados sete compostos, sendo os majoritários carvacrol (77,34%), seguido por γ -terpineno (12,36%) e linalol (6,48%) (Tabela 2). Silva et al. (2010), avaliando o teor de compostos presentes no óleo de

orégano de cinco marcas comerciais, provenientes de diferentes regiões do mundo, identificaram em todas as marcas o carvacrol como componente principal com teores variando de 61,66 a 93,42%, os quais se assemelham com o valor obtido neste trabalho. Segundo Oliveira et al. (2011), os fenóis como o carvacrol e timol podem alcançar a composição química total do óleo em 80,2 a 98% e promover controle de doenças. Porém, em outros estudos com o óleo de orégano foi possível identificar quatro picos referentes aos compostos principais γ -terpineno (33,4%), 4-terpineol (25,59%), timol (14,21%) e carvacrol (2,30%) (BORGES et al., 2012).

O cromatograma para o OETO apresentou 22 picos sobressaindo em relação aos demais óleos citados anteriormente. Dos compostos observados, o timol (26,84%) apresentou maiores teores, seguido do ρ -cimeno (24,04%), carvacrol (21,97%) e α -pineno (5,87%) (Tabela 2). Esses resultados se assemelham aos encontrados por Jakiemiu et al. (2010) os quais constataram no óleo de tomilho os compostos majoritários timol, ρ -cimeno e o γ -terpineno. Por outro lado, Borges et al. (2012), avaliando a composição química de diferentes óleos entre eles o tomilho, constataram nele a presença dos constituintes borneol (66,66%), timol (13,41%) e do linalol (3,24%). Romero et al. (2009) identificaram no óleo de tomilho como principais compostos timol (50%), ρ -cimeno (20%) e o γ -terpineno (18%). Esses autores, ainda, relataram que o efeito antimicrobiano desse óleo na redução do crescimento micelial de *C. musae* e outros micro-organismos é resultante dos compostos timol e carvacrol.

4.2 Avaliação *in vitro* de película à base de fécula mandioca e óleos essenciais na inibição do crescimento micelial e germinação de conídios de *Colletotrichum musae*

Os dados apresentaram aditividade, independência dos erros e homogeneidade de variâncias. Houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) para o índice de crescimento micelial e a porcentagem de germinação de conídios de *Colletotrichum musae*.

Os tratamentos com óleos essenciais de cravo-da-índia, canela e orégano, combinados com película à base de fécula de mandioca nas concentrações de 2 e 3%, apresentaram melhor controle do crescimento micelial e, também, da germinação de conídios (Tabela 3). O óleo de orégano não combinado, bem como o fungicida Tecto SC proporcionaram efeito semelhante aos tratamentos mencionados anteriormente, inibindo o crescimento micelial e germinação do patógeno em 100% (Tabela 3). Romero et al. (2012), também, constataram com óleo de orégano inibição total do crescimento micelial e da germinação de *Corynespora cassiicola*, *Fusarium* sp., *C. gloeosporioides* e *Rhizoctonia solani*. Esses autores atribuíram os resultados à elevada presença dos compostos fenólicos carvacrol e timol no óleo de orégano, os quais são capazes de alterar as proteínas constituintes das membranas celulares e inibir atividades da célula. Esses compostos, também, foram identificados neste trabalho (Tabela 2) e, possivelmente, a alta sensibilidade do patógeno a carvacrol e timol matou as células fúngicas da parte superior do disco de micélio prejudicando o crescimento do fungo.

Tabela 3 Médias do Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) e da porcentagem de germinação de conídios do fungo *Colletotrichum musae in vitro*, submetido a cinco óleos essenciais e esses em combinação com películas de amido em duas concentrações

Tratamentos	*Médias de IVCM (mm/dia)	Tratamentos	*Germinação (%)
Meio malte	10,63 a	Meio ágar-água	98,12 a
Película 2%	10,56 a	Tween 20	87,37 b
Tween 20	10,45 a	Película 2%	87,00 b
Película 3%	10,20 a	Capim-limão	84,37 b
Película 2%+capim-limão	10,11 a	Tomilho	83,75 b
Película 3%+ capim-limão	8,53 b	Película 3%	81,87 b
Película 2%+tomilho	7,10 c	Película 2%+capim-limão	70,50 c
Película 3%+ tomilho	6,96 c	Película 2%+tomilho	62,37 d
Capim-limão	6,62 d	Película 3%+ tomilho	55,87 e
Tomilho	6,38 d	Película 3%+ capim limão	53,37 e
Cravo-da-índia	5,58 e	Cravo-da-índia	22,50 f
Canela	2,28 f	Canela	1,75 g
Película 2%+cravo	0,14 g	Película 3%+canela	1,62 g
Película 3%+ cravo	0,08 g	Película 2%+canela	1,50 g
Película 2%+canela	0,03 g	Película 3%+cravo	1,37 g
Película 3%+canela	0,02 g	Película 2%+cravo	1,55 g
Orégano	0,00 g	Película 2%+orégano	1,00 g
Película 2%+orégano	0,00 g	Película 3%+orégano	0,87 g
Película 3%+orégano	0,00 g	Orégano	0,00 g
Tecto SC	0,00 g	Tecto SC	0,00 g

*Médias seguidas da mesma letra nas colunas não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Scott-Knott. CV(%)IVCM=6,69 CV(%)germinação de conídios=10,52%

O óleo de canela isolado apresentou atividade antifúngica, inibindo o crescimento micelial e germinação em 2,28 mm/dia e 1,75%, respectivamente (Tabela 3). Resultados semelhantes foram obtidos por Maqbool, Ali e Alderson (2010b), com a utilização do óleo de canela; os autores verificaram inibição de 83,2% no crescimento e na germinação de esporos de *C. musae*. Também atribuíram esses resultados ao elevado teor de cinamaldeído, no qual pode reagir com proteínas e ácido nucleico e interferir nos processos celulares. Esse composto juntamente com o eugenol, presentes em cascas de canela possuem

propriedades antimicrobianas já comprovadas na literatura (PATTNAIK; PADHAN; JANA, 2010). Diante dessas informações e observação do resultado da cromatografia para esse óleo (Tabela 2), observa-se que o *trans*-cinamaldeído e o eugenol foram encontrados com elevados teores e, dessa forma, a sua atividade antifúngica pode estar relacionada a esses compostos.

As películas 2 e 3%, combinadas com o óleo de tomilho, e os óleos de cravo-da-índia, tomilho e capim-limão isolados, apresentaram efeito intermediário para o crescimento micelial cujas médias foram 7,10, 6,96, 6,62, 6,38 e 5,58 mm/dia, respectivamente. Na germinação de conídios, o efeito intermediário foi verificado com o óleo de cravo-da-índia isolado, apresentando germinação de 22,50% (Tabela 3).

Vários autores já relataram eficiência dos óleos essenciais de cravo-da-índia, tomilho e capim-limão em experimentos *in vitro*. Romero et al. (2009) verificaram que o óleo de tomilho promoveu inibição do crescimento micelial de *Corynespora cassiicola*, *Sclerotinia minor* e *C. musae*, sendo esse último inibido totalmente na concentração de 5 $\mu\text{L/mL}$. Esse mesmo óleo inibiu 100% o crescimento de *Colletotrichum gloeosporioides*, nas concentrações de 200, 250 e 300 $\mu\text{g/mL}$, entretanto, os autores não constataram redução da geminação com uso do óleo de tomilho e atribuíram esse fato à possível volatilização dos compostos majoritários presentes no mesmo (BARRERA-NECHA et al., 2008). Carnelossi et al. (2009) observaram eficiência antimicrobiana do óleo de capim-limão com maior inibição do crescimento micelial de *C. gloeosporioides* a partir de 10 μL . Rozwalka et al. (2008) verificaram inibição total de *Glomerella cingulata* e *C. gloeosporioides* com óleo de cravo-da-índia e, também, redução de 100% no crescimento micelial de *C. gloeosporioides* com óleo de capim-limão. A ação microbiana do óleo cravo-da-índia foi confirmada com a inibição do crescimento micelial dos fungos *C. musae* e *C. gloeosporioides* (BARBOSA; VIEIRA; TEIXEIRA, 2015; BARRERA-NECHA et al., 2008). Alguns autores

atribuíram a ação microbiana desses óleos aos compostos majoritários timol, citral e eugenol presentes no OETO, OECL e OECL, respectivamente. Segundo Simões e Spitzer (2000), a baixa eficiência de alguns óleos essenciais pode ser atribuída à volatilização dos compostos químicos ou à instabilidade na presença de ar, calor, luz e umidade. Guimarães et al. (2008) observaram a influência da luz e temperatura na degradação dos constituintes principais do óleo de capim-limão. Com esses resultados é possível observar que, apesar dos compostos timol, citral e eugenol terem sido identificados como principais na constituição dos óleos em questão (Tabela 2), possivelmente, em vista das condições ambientais e da elevada atividade volátil desses compostos químicos, não promoveram sensibilidade ao patógeno.

O surfactante Tween 20, utilizado para a solubilização dos óleos essenciais, estimulou o crescimento micelial (10,45 mm/dia) e a germinação de conídios (87,37%) de *C. musae* não diferindo estatisticamente dos tratamentos com os óleos de tomilho e capim-limão (Tabela 3).

As películas de fécula de mandioca 2 e 3% apresentaram crescimento micelial de 10,53 e 10,20 mm/dia e germinação de conídios de 87,00 e 81,87%, respectivamente (Tabela 3). Esses resultados confirmam as suas ineficiências, as quais não diferiram, estatisticamente, no crescimento micelial dos controles meio malte (10,63 mm/dia) e Tween 20 (10,45 mm/dia) e na germinação do controle com Tween 20 (87,37%). Possivelmente, o alto teor de carboidratos presente na fécula de mandioca estimulou o desenvolvimento de *C. musae in vitro*. Porém, em razão da escassez de trabalhos *in vitro*, envolvendo película à base de fécula de mandioca, mais estudos devem ser conduzidos para conhecer melhor o comportamento dos compostos presentes na fécula e se eles exercem alguma atividade sobre o crescimento micelial e germinação de *C. musae*.

4.3 Experimento *in vivo* curativo

Os dados atenderam as pressuposições da ANOVA de aditividade, independência dos erros e homogeneidade de variâncias. Houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os tratamentos analisados.

Os melhores tratamentos foram as películas 2 e 3% isoladas, os óleos essenciais de cravo-da-índia (OECI), capim-limão (OECL) e tomilho (OETO) isolados, os óleos de tomilho e capim-limão combinados com as películas 2 e 3%, e o óleo de cravo-da-índia associado apenas à película 3% (Gráfico 2). As frutas tratadas com esses produtos apresentaram lesões pouco desenvolvidas e com boa aparência externa.

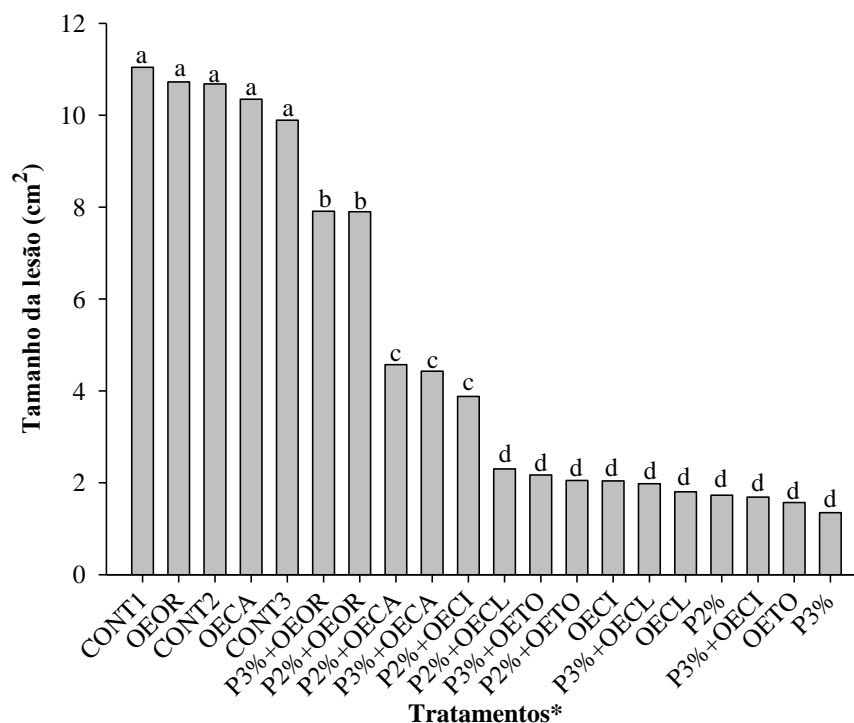


Gráfico 2 Tamanho da lesão de antracnose em bananas tratadas de forma curativa em função dos tratamentos. CONT1: água destilada; OEOR: óleo essencial de orégano; CONT2: Tween 20; OECA: óleo essencial de canela; CONT3: fungicida Tecto SC; P3%+OEOR: película 3% combinada com óleo essencial de orégano; P2%+OEOR: película 2% combinada com óleo essencial de orégano; P2%+OECA: Película 2% combinada com óleo essencial de canela; P3%+OECA: Película 3% combinada com óleo essencial de canela; P2%+OECL: Película 2% combinada com óleo essencial de cravo-da-índia; P2%+OECL: Película 2% combinada com óleo essencial de capim-limão; P3%+OETO: Película 3% combinada com óleo essencial de tomilho; P2%+OETO: Película 2% combinada com óleo essencial de tomilho; OECL: óleo essencial de cravo-da-índia; P3%+OECL: Película 3% combinada com óleo essencial de capim-limão; OECL: óleo essencial de capim-limão; P2%: película fécula de mandioca 2%; P3%+OECL: Película 3% combinada com óleo essencial de cravo-da-índia; OETO: óleo essencial de tomilho; P3%: película fécula de mandioca 3%. *Tratamentos seguidos da mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Scott-Knott. CV(%)=10,28

Resultados semelhantes foram evidenciados, em frutos de mamão, que apresentaram menores lesões quando tratados com óleos de capim-limão, eucalipto, menta e estragão (CARNELOSSI et al., 2009). O óleo de capim-limão reduziu a severidade da antracnose em sorgo, quando foi aplicado em ensaio curativo e preventivo (SARMENTO-BRUM et al., 2013). Oliveira (2013) obteve 100% de controle de antracnose em mamões tratados com película de fécula de mandioca 3% associada ou não a óleos essenciais de cravo-da-índia, tomilho, capim-limão, canela e palmarosa.

Ao contrário do experimento *in vitro*, os óleos essenciais de canela (OECA) e orégano (OEOR), associados ou não com as películas 2 e 3%, não foram eficientes no controle da antracnose; nos mesmos não combinados com as películas, as lesões foram maiores, apresentando tamanhos de 10,35 e 10,68 cm², respectivamente, não diferindo estatisticamente entre si (Gráfico 2). Em vista dos resultados já apresentados na análise cromatográfica para esses óleos (Tabela 2), essa ineficiência *in vivo* pode estar relacionada com a sua elevada volatilidade, a qual não permitiu que os componentes principais identificados nesses óleos interferissem no desenvolvimento do patógeno. Todavia, em outros trabalhos, foram observados efeitos positivos desses óleos no controle de várias doenças (HONG et al., 2015; MAQBOOL; ALI; ALDERSON, 2010b; PEREIRA et al., 2011).

O fungicida Tecto SC apresentou baixa eficiência no controle de *C. musae*, cujo tamanho da lesão foi 9,89 cm² não diferindo estaticamente dos óleos citados anteriormente e dos controles água destilada e Tween 20 que apresentaram lesões com tamanhos de 11,04 e 10,54 cm², respectivamente (Gráfico 2). Esses tratamentos proporcionaram às frutas lesões escuras bem desenvolvidas. Isso, possivelmente, ocorreu em função do uso frequente do fungicida, promovendo estirpes de fungos resistentes. Resultados semelhantes foram encontrados com os fungicidas thiabendazol e tiofanato metílico, os quais

promoveram ineficiência no controle de *C. gloeosporioides* em frutos de mamão (TAVARES; SOUZA, 2005).

As películas de fécula de mandioca 2 e 3% foram eficientes no controle da antracnose, associadas ou não com alguns óleos essenciais, sendo bem mais expressivas na concentração de 3% cujo tamanho médio das lesões foi 1,35 cm² (Gráfico 2). Essas informações, também, foram confirmadas por outros autores, utilizando película de fécula de mandioca (ORIANI et al., 2014) e outros tipos de películas como a quitosana, na qual reduziu em 63% a antracnose em banana (CARRÉ et al., 2006). O bom desempenho das películas apenas *in vivo* pode ser atribuído a alguma propriedade da fécula que age de maneira diferenciada na fruta provocando um obstáculo ao desenvolvimento do patógeno. Porém, são necessários mais estudos visando verificar, principalmente, a influência da fécula de mandioca nas características sensoriais, físicas e bioquímicas da banana. Esses e outros requisitos são fundamentais para prevenir distúrbios fisiológicos e prolongar a vida útil dos frutos.

No teste de longevidade, as frutas provenientes dos melhores tratamentos após o término das avaliações permaneceram com boa aparência visual por mais seis dias, apresentando lesões pequenas e pouco desenvolvidas, evidenciando condições adequadas para o consumo. Desse modo, vale ressaltar a importância dessa etapa para a exportação e comercialização de frutas, visto que o mercado é exigente por frutas com boa qualidade e maior durabilidade de prateleira.

Nas observações das imagens realizadas em microscopia eletrônica de varredura, foi possível confirmar os resultados apresentados anteriormente. Nas Figuras 1A e 1B, observa-se intensidade de hifas desenvolvidas, decorrente da ação do patógeno na superfície de frutas imersas apenas em água destilada e Tween 20, respectivamente. No tratamento com fungicida, foi possível observar germinação de conídios, os quais são responsáveis pelo início do processo

infeccioso, que leva ao desenvolvimento da doença, confirmando, assim, a ineficiência do Tecto SC no controle curativo de *C. musae* (Figura 1C).

As películas à base de fécula de mandioca 2 e 3% isoladas interferiram nos eventos de germinação e penetração do processo infeccioso de *C. musae* em bananas. Formaram uma camada protetora que retardou o desenvolvimento do patógeno e impediu a germinação de conídios, deixando-os firmemente aderidos a ela (Figuras 1D e 2A). Esses resultados corroboram com os obtidos por Oliveira (2013), os quais observaram uma barreira protetora com a aplicação da película de fécula de mandioca a 3% em frutos de mamão e impediu o desenvolvimento de lesões de *C. gloeosporioides*.

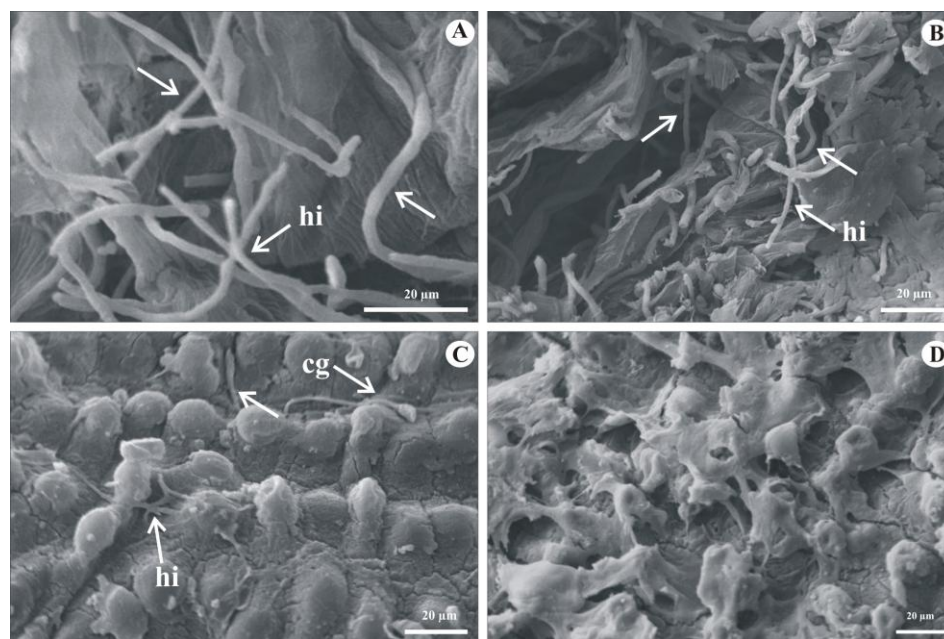


Figura 1 Eletromicrografias de varredura de fragmentos da casca de bananas, infectadas com *C. musae*. A e B: hifas bem desenvolvidas em superfície de frutas tratadas com água destilada e Tween 20, respectivamente. C: conídios germinados e hifas na superfície de fruta tratada com fungicida Tecto SC. D: camada protetora, promovida pelas películas 2 e 3%. hi: hifas, cg: conídio germinado

A película 2%, quando combinada com os OECL e OETO, promoveu efeito sinérgico, porém combinada com os OECL, OECA e OEOR provocou intensa colonização, desenvolvimento de hifas ramificadas e ruptura da cutícula com formação de acérvulo, respectivamente (Figuras 2B, 2C e 2D).

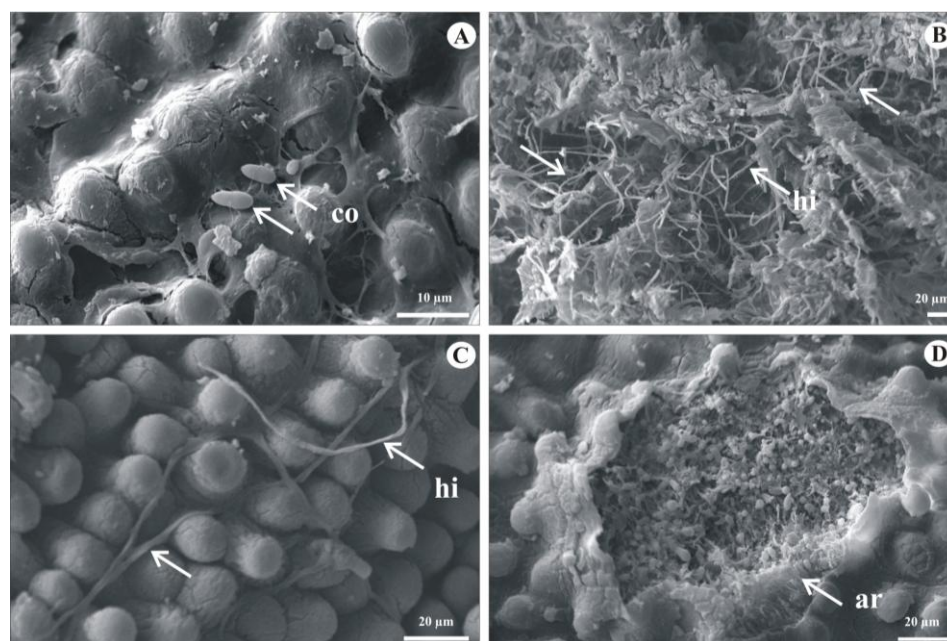


Figura 2 Eletromicrografias de varredura de fragmentos da casca de bananas, infectadas com *C. musae*. A: conídios não germinados aderidos a camada protetora, promovida pelas películas 2 e 3%. B, C e D: colonização intensa, hifas ramificadas bem desenvolvidas e ruptura da cutícula com presença de acérvulo resultante da ação da película 2% combinada com os óleos essenciais de cravo-da-índia, canela e orégano, respectivamente. hi: hifas, co: conídio, ar: acérvulo

Nos fragmentos coletados dos tratamentos com película 3% associada aos OETO e OECL, foi observada casca da fruta sem alterações com conídios não germinados (Figura 3A). Entretanto, nas frutas tratadas com película 3% e óleo de orégano, foi possível verificar penetração de tubo germinativo pelo estômato (Figura 3B).

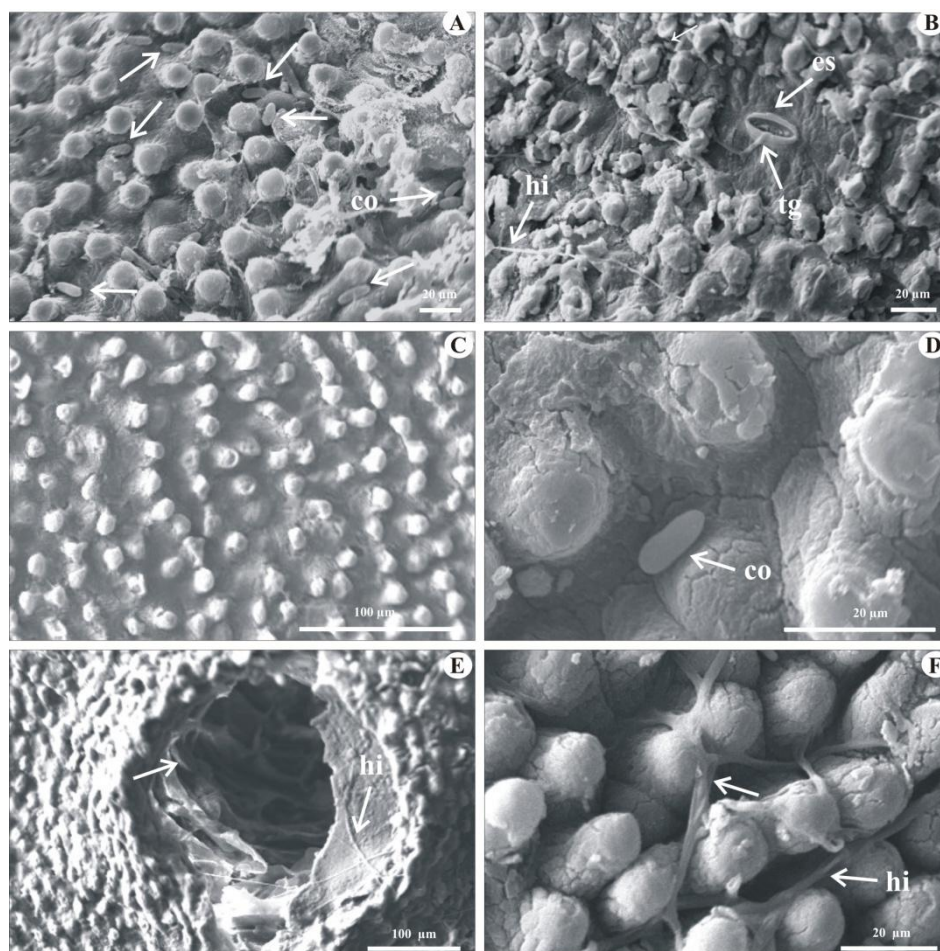


Figura 3 Eletromicrografias de varredura de fragmentos de casca de bananas, infectadas com *C. musae*. A: conídios não germinados na casca de fruta tratada com película de fécula de mandioca 3%+óleo essencial de tomilho. B: penetração de tubo germinativo pelo estômato em fruta tratada com película de fécula de mandioca 3%+óleo essencial de orégano. C: superfície externa da banana inalterada tratada com óleo essencial de cravo-da-índia. D: conídio não germinado na casca de fruta tratada com óleo essencial de capim-limão. E e F: colonização no local da inoculação e hifas bem desenvolvidas resultante da ação dos óleos essenciais de canela e orégano, respectivamente. co: conídio, tg: tubo germinativo, es: estômato, hi: hifas

Nas imagens referentes à ação isolada dos óleos essenciais de cravo-da-índia e tomilho, observaram-se a superfície externa da fruta intacta sem deformações e conídio não germinado, respectivamente (Figuras 3C e 3D). Entretanto, nas frutas tratadas com os óleos de canela e orégano, observaram-se intensa colonização no local da inoculação e hifas bem desenvolvidas (Figuras 3E e 3F). Esses óleos essenciais não promoveram alterações ultraestruturais no patógeno, provavelmente, em virtude da sua baixa fixação na casca das bananas, o que acarretou na manifestação da antracnose. Diversos autores já relataram o modo de ação de óleos essenciais sob fitopatógenos. Por meio da MEV, Rozwalka (2010) observou, em goiabas tratadas com óleo de tomilho, colapsamento de hifas e da extremidade do tubo germinativo dos conídios. Borges (2011), também, observou que o óleo essencial de cravo-da-índia não promoveu alteração no tecido da casca de bananas.

4.4 Experimento *in vivo* preventivo

Após a confirmação das pressuposições da análise de variância, constatou-se que houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os tratamentos.

Os tratamentos que proporcionaram melhor controle preventivo da antracnose foram os óleos essenciais de capim-limão (OECL) e tomilho (OETO) isolados, as películas 2 e 3% isoladas e associadas com os óleos de capim-limão e tomilho e o fungicida Tecto SC não apresentaram diferença significativa entre si (Gráfico 3). O tamanho médio das lesões nesses tratamentos foi em torno de 1,88 cm². As bananas tratadas com esses produtos mostraram-se protegidas com lesões controladas.

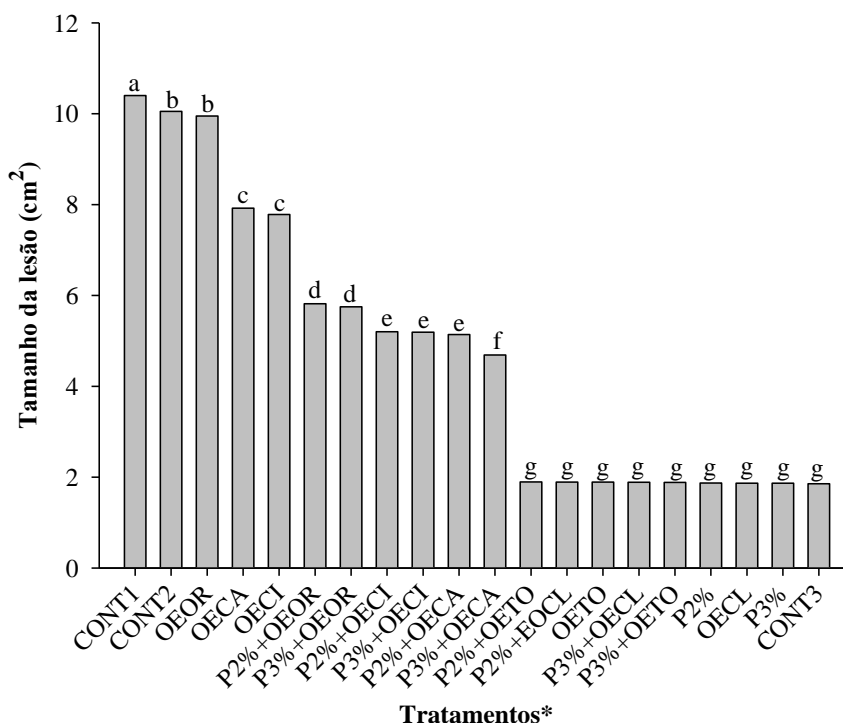


Gráfico 3 Tamanho da lesão de antracnose em bananas tratadas de forma preventiva em função dos tratamentos. CONT1: água destilada; CONT2: Tween 20; OEOR: óleo essencial de orégano; OECA: óleo essencial de canela; OECI: óleo essencial de cravo-da-índia; P2%+OEOR: película 2% combinada com óleo essencial de orégano; P3%+OEOR: película 3% combinada com óleo essencial de orégano; P2%+OECI: película 2% combinada com óleo essencial de cravo-da-índia; P3%+OECI: película 3% combinada com óleo essencial de cravo-da-índia; P2%+OECA: película 2% combinada com óleo essencial de canela; P3%+OECA: película 3% combinada com óleo essencial de canela; P2%+OETO: película 2% combinada com óleo essencial de tomilho; P2%+OECL: película 2% combinada com óleo essencial de capim-limão; OETO: óleo essencial de tomilho; P3%+OECL: película 3% combinada com óleo essencial de capim-limão; P3%+OETO: película 3% combinada com óleo essencial de tomilho; P2%: película de fécula de mandioca 2%; OECL: óleo essencial de capim-limão; P3%: película de fécula de mandioca 3%, CONT3: fungicida Tecto SC
*Tratamentos seguidos da mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Scott-Knott. CV(%)= 6,06

Muitos estudos, também, comprovaram que óleos essenciais de capim-limão e tomilho associados ou não com películas foram eficientes no controle de doenças. Bosquez-Molina et al. (2010) indicaram que a combinação de goma de algaroba a 10% e óleo de tomilho a 0,1% provocou redução de 100% da antracnose em frutos de mamão. Em abacate, o óleo de tomilho a 1% em combinação com quitosana a 1% reduziu as lesões provenientes da antracnose (BILL et al., 2014). Moura et al. (2012) constataram, em frutos de maracujá, redução na severidade da antracnose com a utilização do óleo de capim-limão na concentração de 0,1%. Lesões em pimentas foram reduzidas pelo efeito de diversos óleos essenciais, incluindo canela, capim-limão e tomilho (HONG et al., 2015). Garcia et al. (2008) constataram, com aplicação de citral a 1,0% em frutos de mamão e bananas, redução de 70% no desenvolvimento de lesões. Esses autores atribuíram à atividade antifúngica do óleo de capim-limão a presença elevada de citral na sua constituição, o qual, também, foi identificado neste estudo em maiores quantidades (Tabela 2).

A eficiência do fungicida Tecto SC apenas de forma preventiva e não curativa, possivelmente, está relacionada ao mecanismo de ação do produto que atua como inibidores da biossíntese de tubulina no núcleo celular, impedindo a germinação do conídio. Além disso, segundo recomendações do fabricante, a aplicação desse produto deve ser realizada em frutas verdes, as quais devem ser imersas na solução ou pulverizadas, logo após a colheita. De forma semelhante, Negreiros et al. (2013), também, verificaram controle da antracnose em frutas de banana 'Prata' com a utilização do fungicida Tecto SC.

Os óleos essenciais de cravo-da-índia (OECI), canela (OECA) e orégano (OEOR) isolados e, em associação com as películas 2 e 3%, não foram eficientes no controle da doença, visto que as frutas tratadas com óleo de orégano tiveram maior desenvolvimento das lesões com tamanho médio de 9,94 cm² (Gráfico 3). Os compostos majoritários, identificados nesses óleos (Tabela 2), não

desempenharam ação no patógeno na superfície da fruta aumentando o tamanho das lesões, devido à provável interferência das características dos óleos essenciais como concentração, volatilização, solubilidade limitada em água e instabilidade na presença de luz, calor e umidade (SIMÕES; SPITZER, 2000).

No teste de longevidade para o controle preventivo, as frutas oriundas dos melhores tratamentos, após o término das avaliações, permaneceram em bancada por mais sete dias, apresentando bom aspecto visual e condições apropriadas para o consumo e, também, para o comércio, que procura por frutas com vida útil mais prolongada.

Por meio das imagens obtidas na microscopia eletrônica de varredura, foi possível visualizar o desenvolvimento normal do patógeno, com presença de hifas colonizando o epicarpo da fruta imersa apenas em água destilada (Figura 4A). Como esperado, o fungicida causou degradação celular e retardou a germinação do fungo (Figura 4B).

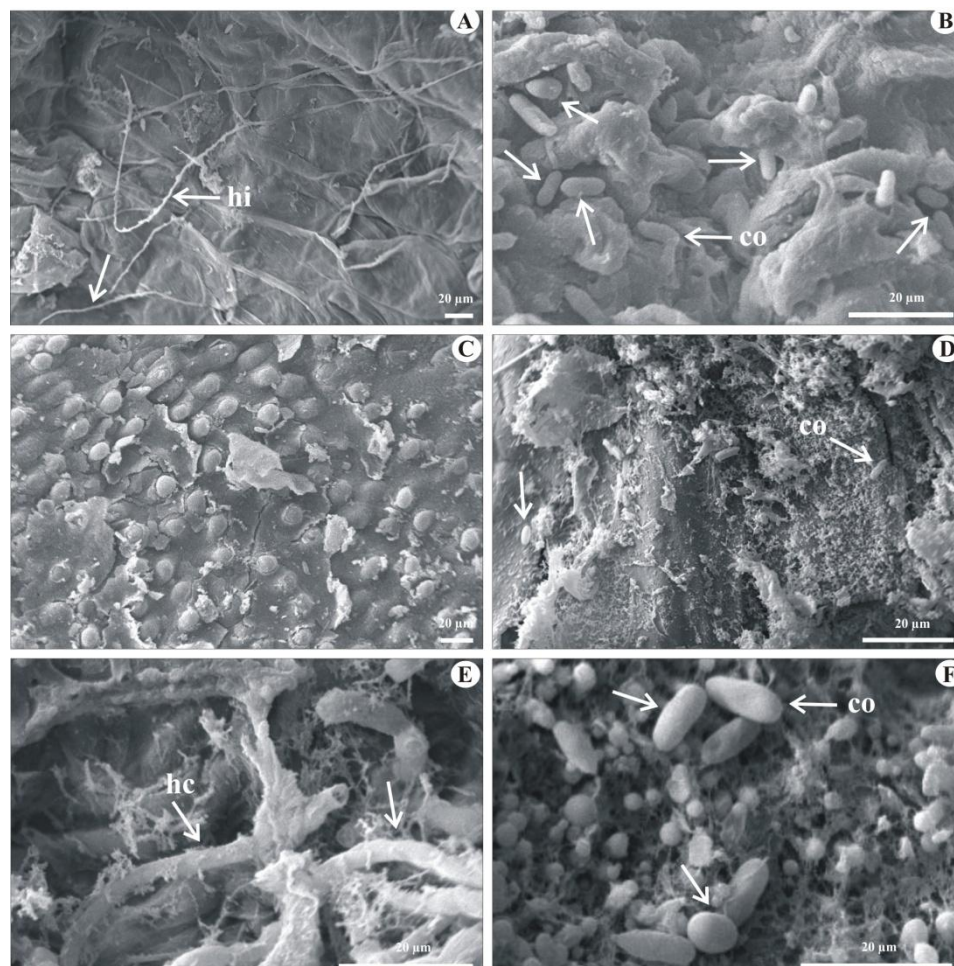


Figura 4 Eletromicrografias de varredura de fragmentos de casca de bananas, infectadas com *C. musae*. A: hifas de *C. musae* bem desenvolvidas no epicarpo de fruta imersa em água destilada. B: conídios não germinados em fragmento de fruta tratada apenas com fungicida Tecto SC. C e D: barreira protetora e conídios não germinados em frutas tratadas com película à base de fécula de mandioca a 2 e 3%, respectivamente. E e F: hifas colapsadas e conídios não germinados em cascas de bananas sob o efeito da película de fécula de mandioca 2%+óleo essencial de tomilho e da película de fécula de mandioca 3%+óleo essencial de capim-limão, respectivamente. hi: hifas, co: conídio, hc: hifas colapsadas

Semelhante ao experimento curativo, as películas 2 e 3%, isoladamente, promovem alterações ultraestruturais no patógeno. Nas imagens obtidas por MEV, foi possível observar uma barreira protetora no epicarpo da fruta e, também, alguns conídios não germinados sem formação de hifas (Figuras 4C e 4D). Em frutos de goiaba foi observado que áreas revestidas totalmente com película de fécula de mandioca a 2% houve limitação da colonização e reprodução de *C. gloeosporioides*. Porém, a penetração do patógeno foi favorecida em frutos revestidos de forma desuniforme (ROZWALKA, 2010). Portanto, é importante ressaltar que, na etapa de preparo e revestimento de frutos com películas biodegradáveis, é necessário tomar cuidados para que toda a superfície externa dos frutos seja coberta de maneira uniforme e, assim, evitar áreas de escape que permitam a entrada de micro-organismos. Diante desses conhecimentos, acredita-se que a eficiência das películas possa estar relacionada ao recobrimento correto e uniforme nas bananas.

A associação das películas 2 e 3% com alguns óleos promoveram efeito sinérgico, por exemplo, com os óleos de tomilho e capim-limão houve formação de hifas colapsadas e inviabilização da germinação, respectivamente (Figuras 4E e 4F). Resultados semelhantes foram constatados por Rozwalka (2010), ao observar que a película 2%, incorporada ou não aos óleos de palmarosa, tomilho, cravo-da-índia, canela e capim-limão a 0,1% reduziu a antracnose em frutos de goiaba e promoveu uma camada protetora que impediu a germinação de *C. gloeosporioides*.

Os óleos aplicados de maneira isolada provocaram ações distintas no patógeno. Foi possível verificar conídios sem germinar e deformados, evidenciando ação protetora dos OECL e OETO (Figuras 5A e 5B). Zambonelli et al. (1996), também, observaram por meio da MEV a ação do óleo de tomilho atuando na degeneração de hifas, extravasamento celular e inviabilização da germinação de *Colletotrichum lindemuthianum* e *Pythium ultimum*. Rozwalka

(2010) observou, em goiabas tratadas com óleo de tomilho, o colapsamento de hifas e tubo germinativo dos conídios de *C. gloeosporioides*.

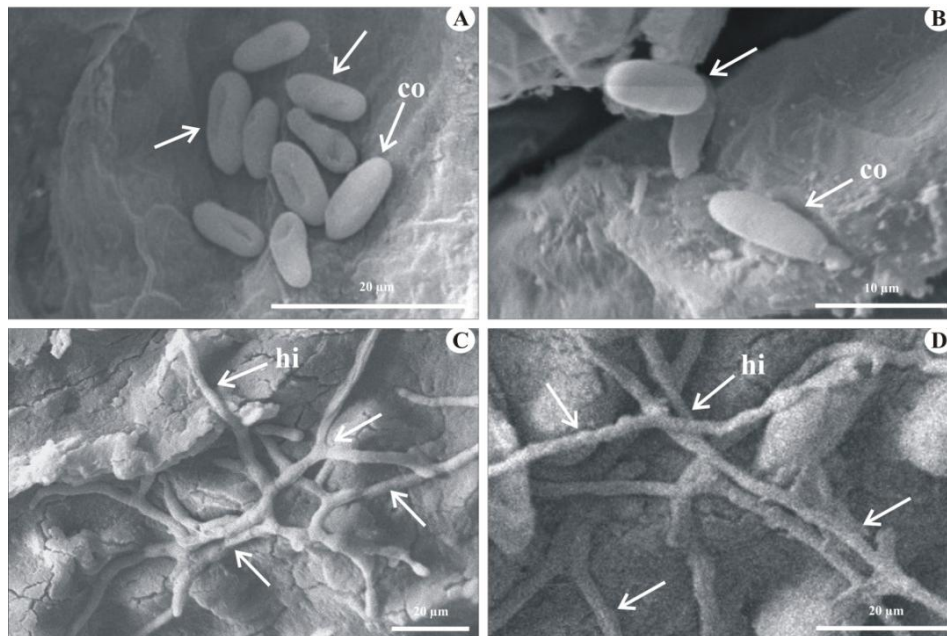


Figura 5 Eletromicrografias de varredura de fragmentos de casca de bananas, infectadas com *C. musae*, A e B: conídios deformados em bananas tratadas com os óleos de tomilho e capim-limão, respectivamente. C e D: hifas longas e uniformes promovidas pela ação dos óleos essenciais de canela e orégano, respectivamente. co: conídios, hi: hifas

Nos fragmentos coletados a partir de frutas tratadas com os OECl, OECA e OEOR foi observado desenvolvimento normal do patógeno com formação de hifas alongadas e uniformes (Figuras 5C e 5D). Resultados diferentes indicaram que o óleo de canela foi capaz de reduzir a incidência e severidade da cercosporiose em café e provocar extravasamento do conteúdo celular agindo diretamente no patógeno (PEREIRA et al., 2011).

Alguns tratamentos apresentaram efeitos relevantes tanto isolados como combinados, isso pode estar relacionado com algumas propriedades da fécula de mandioca e com características dos óleos essenciais, entre elas, volatilização, solubilidade, concentração e condições ambientais de umidade, luz e temperatura (GUIMARÃES et al., 2008; SIMÕES; SPITZER, 2000). Porém existe uma grande complexidade nos mecanismos de ação dos óleos essenciais e da fécula de mandioca que ainda não são conhecidos, podendo ocorrer desnaturação de proteínas e desintegração de membranas durante o processo infeccioso do patógeno (JANSSEN, 2000). Isso indica que são necessários mais estudos que investiguem esses e outros aspectos ligados à atuação desses produtos alternativos na pós-colheita de frutíferas.

5 CONCLUSÕES

A aplicação do óleo essencial de orégano *in vitro* inibe totalmente o crescimento micelial e germinação dos conídios de *Colletrotrichum musae*.

As películas 2 e 3% não exercem atividade sobre o fungo *in vitro*, mas *in vivo* impedem a germinação e penetração do patógeno em bananas.

Os óleos essenciais de capim-limão e tomilho, as películas 2 e 3%, assim como a combinação dos mesmos, são eficientes na redução de lesões da antracnose, em bananas tratadas de forma curativa e preventiva, podendo serem indicados (as) como estratégia viável no controle alternativo pós-colheita.

A MEV é uma ferramenta adequada para visualizar as alterações ultraestruturais no patógeno promovidas pela ação das películas 2 e 3% e dos óleos essenciais.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, M. A. et al. *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 43, n. 2, p. 399-408, abril/jun. 2012.

BARBOSA, M.; VIEIRA, G.; TEIXEIRA, A. Atividade biológica *in vitro* de própolis e óleos essenciais sobre o fungo *Colletotrichum musae* isolado de bananeira (*Musa* spp.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Paulínia, v. 17, n. 2, p. 254-261, abril/jun. 2015.

BARRERA-NECHA, L. L. et al. Efficacy of essential oils on the conidial germination, growth of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. and Sacc and control of postharvest diseases in papaya (*Carica papaya* L.). **Plant Pathology Journal**, Teheran, v. 7, n. 2, p. 174-178, 2008.

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

BERALDO, C. et al. Eficiência de óleos essenciais de canela e cravo-da-índia como sanitizantes na indústria de alimentos. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 43, n. 4, p. 436-440, out./dez. 2013.

BILL, M. et al. The efficacy of combined application of edible coatings and thyme oil in inducing resistance components in avocado (*Persea americana* Mill.) against anthracnose during post-harvest storage. **Crop Protection**, Amsterdam, v. 64, p. 159-167, Oct. 2014.

BORGES, A. M. et al. Determinação de óleos essenciais de alfavaca (*Ocimum gratissimum* L.), orégano (*Origanum vulgare* L.) e tomilho (*Thymus vulgaris* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Paulínia, v. 14, n. 4, p. 656-665, 2012.

BORGES, D. I. **Óleos essenciais no comportamento da antracnose e na pós-colheita de banana 'Prata'**. 2011. 66 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

BOSQUEZ-MOLINA, E. et al. 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, Aug. 2010.

BRASIL. Ministério da Integração Nacional. **Banana, 2000**. Brasília, 2008. Disponível em: <<http://www.integração.gov.br>>. Acesso em: 8 jun. 2008.

CARNELOSSI, P. R. et al. Óleos essenciais no controle pós-colheita de *Colletotrichum gloeosporioides* em mamão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Paulínia, v. 11, n. 4, p. 399-406, Nov. 2009.

CARRÉ, V. et al. Controle pós-colheita de *Colletotrichum musae* em banana (*Musa* sp.) por cânfora (*Artemisia camphorata*) e quitosana. **Scientia Agrária Paranaensis**, Curitiba, v. 5, n. 1, p. 57-66, 2006.

CASTRO, H. G. et al. Crescimento, teor e composição do óleo essencial de *Cymbopogon nardus* (L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Paulínia, v. 9, n. 4, p. 55-61, 2007.

COSTA, D. M.; ERABADUPITIYA, H. R. U. T. An integrated method to control postharvest diseases of banana using a member of the *Burkholderia cepacia* complex. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 36, n. 1, p. 31-39, 2005.

DOOL, H. van den; KRATZ, D. J. A. Generalization of the retention index system including liner temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography**, Oxford, v. 11, p. 463-471, 1963.

FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, Lavras, v. 6, n. 2, p. 36-41, 2008.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Produção de banana, 2013**. Disponível em: <<http://www.fao.org/>>. Acesso em: 10 fev. 2016.

GARCIA, R. et al. Antimicrobial activity and potential use of monoterpenes as tropical fruits preservatives. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 39, n. 1, p. 163-168, jan./mar. 2008.

GUIMARÃES, L. G. D. L. et al. Influência da luz e da temperatura sobre a oxidação do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf). **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 6, p. 1476-1480, Ago. 2008.

HONG, J. K. et al. Application of volatile antifungal plant essential oils for controlling pepper fruit anthracnose by *Colletotrichum gloeosporioides*. **The Plant Pathology Journal**, Korea, v. 31, n. 3, p. 269-277, Sep. 2015.

JAKIEMIU, E. A. R. et al. Estudo da composição e do rendimento do óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris* L.). **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 3, p. 683-688, 2010.

JANSSEN, A. M. Antimicrobial activities of essential oils: a pharmacognostical study. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Rio Grande do Norte, v. 3, n. 16, p. 38-43, 2000.

LIMA, M. P. et al. Constituintes voláteis das folhas e dos galhos de *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae). **Acta Amazônica**, Manaus, v. 35, n. 3, p. 363-366, 2005.

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

MAQBOOL, M.; ALI, A.; ALDERSON, P. G. A combination of gum arabic and chitosan can control anthracnose caused by *Colletotrichum musae* and enhance the shelf-life of banana fruit. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, London, v. 85, n. 5, p. 432-436, Sep. 2010a.

MAQBOOL, M.; ALI, A.; ALDERSON, P. G. Effect of cinnamon oil on incidence of anthracnose disease and postharvest quality of bananas during storage. **International Journal of Agriculture & Biology**, Pakistan, v. 12, n. 4, p. 516-520, July 2010b.

MOURA, G. S. et al. Controle da antracnose em maracujá-amarelo por derivados de capim-limão (*cymbopogon citratus*). **Revista Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 79, n. 3, p. 371-379, jul./set. 2012.

NEGREIROS, R. J. Z. D. et al. Controle da antracnose na pós-colheita de bananas-‘Prata’ com produtos alternativos aos agrotóxicos convencionais 1. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 35, n. 1, p. 51-58, Março 2013.

OLIVEIRA, B. F. de. **Película de amido de mandioca, associada ou não, a óleos essenciais no controle pós-colheita da antracnose em mamão**. 2013. 92 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

OLIVEIRA, J. A. **Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativus* L.) e pimentão (*Capsicum annum* L.)**. 1991. 111 p. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) - Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, 1991.

OLIVEIRA, M. M. M. et al. Rendimento, composição química e atividade antilisterial de óleos essenciais de espécies de *Cymbopogon*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Paulínia, v. 13, n. 1, p. 8-16, Fev. 2011.

OLIVEIRA, R. A. D. et al. Constituintes químicos voláteis de especiarias ricas em eugenol. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 19, n. 3, p. 771-775, july/sep. 2009.

ORIANI, V. B. et al. Properties of cassava starch-based edible coating containing essential oils. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 79, n. 2, p. E189-E194, Jan. 2014.

PATTNAIK, S.; PADHAN, D. K.; JANA, G. K. Evaluation of cinnamon oil, peppermint oil, cardamom oil and orange oil as antimicrobial agents. **Journal of Pharmacy Research**, New Delhi, v. 3, n. 2, p. 414-416, Feb. 2010.

PEREIRA, R. B. et al. Potential of essential oils for the control of brown eye spot in coffee plants. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 1, p. 115-123, jan./fev. 2011.

ROMERO, A. L. et al. Atividade do óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) contra fungos fitopatogênicos. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 11, n. 4, p. 15-18, 2009.

ROMERO, A. L. et al. Composição química e atividade do óleo essencial de *Origanum vulgare* sobre fungos fitopatogênicos. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 14, n. 4, p. 231-235, 2012.

ROZWALKA, L. C. **Óleos essenciais: ação sobre *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum musae*, associados ou não à película de fécula de mandioca no controle da antracnose em goiaba**. 2010. 198 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

ROZWALKA, L. C. et al. Extracts, decoctions and essential oils of medicinal and aromatic plants in the inhibition of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Glomerella cingulata* isolates from guava fruits. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 2, p. 301-307, mar./apr. 2008.

SARMENTO-BRUM, R. B. C. et al. Efeito de óleos essenciais de plantas medicinais sobre a antracnose do sorgo. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 29, n. 5, p. 1549-1557, mar./abr. 2013.

SCHERER, R. et al. Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**, Paulínia, v. 11, n. 4, p. 442-449, Nov. 2009.

SILVA, J. P. L. et al. Óleo essencial de orégano: interferência da composição química na atividade frente a *Salmonella Enteritidis*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 1, p. 136-141, Maio 2010.

SILVESTRI, J. D. F. et al. Perfil da composição química e atividades antibacteriana e antioxidante do óleo essencial do cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata* Thunb.). **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 57, n. 5, p. 589-594, Out. 2010.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Ed.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Porto Alegre: UFRGS, 2000. p. 387-415.

SNOUSSI, M. et al. *In-vitro* anti-Vibrio spp. activity and chemical composition of some Tunisian aromatic plants. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 24, n. 12, p. 3071-3076, Dec. 2008.

SOUSA, M. P. et al. **Constituintes químicos ativos de plantas medicinais brasileiras**. Fortaleza: UFC, 1991. 416 p.

TAVARES, G. M.; SOUZA, P. D. 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.

ZAMBONELLI, A. et al. Effects of essential oils on phytopathogenic fungi *In Vitro*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 144, n. 9/10, p. 491-494, 1996.