



VANESSA PASSAGLIA

**ÓLEOS ESSENCIAIS NO CONTROLE DE *Rhizopus stolonifer*
E *Botrytis cinerea* EM MORANGOS**

LAVRAS - MG

2017

VANESSA PASSAGLIA

ÓLEOS ESSENCIAIS NO CONTROLE DE *Rhizopus stolonifer* E *Botrytis cinerea* EM MORANGOS

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. Paulo Estevão de Souza

Coorientador: Dr. Fernando Pereira Monteiro

LAVRAS – MG

2017

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

Passaglia, Vanessa .

Óleos essenciais no controle de *Rhizopus stolonifer* e *Botrytis cinerea* em morangos / Vanessa Passaglia. - 2017.

49 p.

Orientador(a): Paulo Estevão de Souza.

Coorientador(a): Fernando Pereira Monteiro.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2017.

Bibliografia.

1. Óleos essenciais. 2. Pós-colheita. 3. Morango. I. Souza, Paulo Estevão de. II. Monteiro, Fernando Pereira. III. Título.

VANESSA PASSAGLIA

ÓLEOS ESSENCIAIS NO CONTROLE DE *Rhizopus stolonifer* E *Botrytis cinerea* EM MORANGOS

ESSENTIAL OILS IN CONTROL OF *Rhizopus stolonifer* AND *Botrytis cinerea* IN STRAWBERRIES

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 27 de abril de 2017

Dr. Paulo Estevão de Souza	UFLA
Dr. Eduardo Alves	UFLA
Dr. Rodrigo Luz da Cunha	EPAMIG Lavras

Prof. Dr. Paulo Estevão de Souza
(Orientador)

LAVRAS – MG

2017

*Aos meus pais por serem meus exemplos de educação e vida, e minhas irmãs
pelo carinho e amor incondicional.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela vida, sabedoria, proteção e por me dar forças para a realização desse sonho.

A minha família, meus pais, Osvaldo e Martha, e minhas irmãs Jaqueline e Patrícia, que sempre se esforçaram muito para que eu realizasse meus sonhos.

A Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Fitopatologia pela oportunidade e contribuição no meu crescimento profissional.

A Capes, pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao Prof. Dr. Paulo Estevão de Souza pela orientação e paciência.

Ao meu coorientador Dr. Fernando Pereira Monteiro pela amizade, paciência, ensinamentos e apoio para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos membros da banca Dr. Eduardo Alves e Dr. Rodrigo Luz da Cunha pela participação e disposição.

A Rafael de Paula Guedes pela ajuda na realização dos experimentos, apoio, carinho, companheirismo, pelas várias brincadeiras e momentos de alegria.

A todos os servidores técnico-administrativos do Departamento de Fitopatologia, pela paciência e amizade.

Aos demais professores do Departamento de Fitopatologia, pelos conhecimentos transmitidos.

E a todos aqueles que, direta ou indiretamente, colaboraram para o cumprimento desta importante etapa da minha vida.

Obrigada!

RESUMO

O morango (*Fragaria x ananassa* Duch) é um fruto muito perecível e vulnerável à infecção por fungos, resultando em podridões e perdas econômicas. A inexistência de produtos autorizados para o controle de *Botrytis cinerea* e *Rhizopus stolonifer*, em pós-colheita de morango, resulta em grandes perdas para o produtor, levando ao uso incorreto de defensivos. Em razão disto, busca-se a substituição de defensivos sintéticos por métodos alternativos, como o uso de óleos essenciais, para inibir o crescimento do fungo, e conseqüentemente a deterioração dos frutos. Diante do exposto, os objetivos deste trabalho foram: (i) análise da composição química dos óleos essenciais de *Litsea cubeba*, *Foeniculum vulgare* var. *dulce*, *Pelargonium graveolens* e *Eucaliptus citriodora*; (ii) avaliar o efeito *in vitro* dos voláteis destes óleos essenciais no crescimento micelial de *B. cinerea* e *R. stolonifer*; (iii) avaliar o efeito dos voláteis destes óleos essenciais sobre a germinação dos conídios de *B. cinerea* e *R. stolonifer*; (iv) avaliar *in vivo* o efeito dos voláteis dos óleos essenciais mais promissores no controle de *B. cinerea* e *R. stolonifer* em frutos de morangos; (v) avaliar *in vivo* o efeito do volátil do composto majoritário, do óleo essencial mais promissor, no controle de *B. cinerea* e *R. stolonifer* em frutos de morangos. Quanto a análise química os componentes majoritários dos óleos de *L. cubeba*, *F. vulgare* var. *dulce*, *P. graveolens* e *E. citriodora* foram geraniol 32,03%, trans-anethole 48,81%, citronellol 24,94% e citronellal 54,74%, respectivamente. *In vitro* os óleos que foram mais eficientes foram *L. cubeba* e *F. vulgare* var. *dulce*, tanto no crescimento micelial como na germinação de conídios de *B. cinerea* e *R. stolonifer*. *In vivo* o óleo essencial de *L. cubeba* promoveu um controle parcial das doenças, já o óleo de *F. vulgare* var. *dulce* e seu componente majoritário trans-anethole na concentração de 10% apresentou 100% de controle nos frutos de morango. Portanto tanto os voláteis do óleo essencial de *F. vulgare* var. *dulce* como do seu componente majoritário o trans-anethole possuem potencial para o controle dos fungos de pós-colheita, *B. cinerea* e *R. stolonifer*, mostrando-se como opção promissora para o desenvolvimento de possíveis produtos fitossanitários para o manejo de doenças em pós-colheita em morangos.

Palavras-chave: Controle alternativo. Pós-colheita. Óleos essenciais. *B. cinerea*. *R. stolonifer*

ABSTRACT

The strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch) is very perishable and vulnerable to fungal infection, resulting in decay and economic losses. The lack of approved products to control *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer* in postharvest strawberry results in large losses for the producer, leading to incorrect use of pesticides. For this reason, the substitution of synthetic pesticides by alternative methods is sought, such as the use of essential oils, to inhibit the growth of the fungus, and consequently the deterioration of the fruits. In view of the above, the objectives of this work were: (i) analysis of the chemical composition of the essential oils of *Litsea cubeba*, *Foeniculum vulgare* var. *dulce*, *Pelargonium graveolens* and *Eucaliptus citriodora*; (ii) to evaluate the *in vitro* effect of the volatiles of these oils on the mycelial growth of *B. cinerea* and *R. stolonifer*; (iii) to evaluate the effect of the volatiles of these oils on the germination of the conidia of *B. cinerea* and *R. stolonifer*; (iv) to evaluate *in vivo* the effect of volatiles of essential oils on the control of *B. cinerea* and *R. stolonifer* on strawberry fruits; (v) to evaluate *in vivo* the effect of the volatile of the major compound, of the most promising essential oil, in the control of *B. cinerea* and *R. stolonifer* on strawberry fruits. As for chemical analysis, the major components of *L. cubeba* oils, *F. vulgare* var. *dulce*, *P. graveolens* and *E. citriodora* were geraniol 32.03%, trans-anethole 48.81%, citronellol 24.94% and citronellal 54.74%, respectively. *In vitro* the oils that were most efficient were *L. cubeba* and *F. vulgare* var. *dulce*, both mycelial growth and germination of conidia of *B. cinerea* and *R. stolonifer*. *In vivo* the essential oil of *L. cubeba* promoted a partial control of the diseases, already the oil of *F. vulgare* var. *dulce* and its major component trans-anethole, in the concentration of 10%, presented 100% control in strawberry fruits. Therefore, both the volatiles of the essential oil of *F. vulgare* var. *dulce* as its major component trans-anethole have potential for the control of post-harvest fungi, *B. cinerea* and *R. stolonifer*, proving to be a promising option for the development of possible phytosanitary products for the management of post-harvest diseases in strawberries.

Keywords: Alternate control. Post-harvest. Essential oils. *B. cinerea*. *R. stolonifer*.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 Óleos essenciais no controle de <i>Rhizopus stolonifer</i> e <i>Botrytis cinerea</i>	
.....	11
1 INTRODUÇÃO	12
2 REFERENCIAL TEÓRICO	14
REFERÊNCIAS	19
CAPÍTULO 2 Efeito de óleos essenciais e do componente trans-anethole sobre <i>Botrytis cinerea</i> e <i>Rhizopus stolonifer</i> em morangos	23
RESUMO	24
ABSTRACT	25
1 INTRODUÇÃO	26
2 MATERIAL E MÉTODOS	28
2.1 Local de realização dos experimentos	28
2.2 Obtenção dos isolados e óleos essenciais	28
2.3 Pré - seleção dos óleos essenciais	28
2.4 Determinação da composição química	29
2.5 Bioatividade de componentes voláteis de óleos essenciais sobre o crescimento micelial de <i>B. cinerea</i> e <i>R. stolonifer</i>	29
2.6 Bioatividade de componentes voláteis de óleos essenciais sobre a germinação dos conídios de <i>B. cinerea</i> e <i>R. stolonifer</i>	30
2.7 Efeito protetor dos componentes voláteis dos dois melhores óleos essenciais contra <i>R. stolonifer</i> e <i>B. cinerea</i> em morangos	31
2.8 Efeito protetor dos voláteis do componente majoritário do melhor óleo essencial contra <i>R. stolonifer</i> e <i>B. cinerea</i> em morangos	31
2.9 Análises estatísticas	32
3 RESULTOS E DISCUSSÃO	33
3.1 Seleção dos óleos essenciais	33
3.2 Análise química dos óleos essenciais selecionados	34
3.3 Crescimento micelial sob o efeito dos componentes voláteis dos óleos essenciais selecionados	37
3.4 Germinação conidial sob o efeito dos componentes voláteis dos óleos essenciais selecionados	39

3.5 Efeito protetor dos componentes voláteis dos melhores óleos essenciais sobre morangos	40
3.6 Efeito protetor do volátil do componente majoritário sobre morangos.....	43
4 CONCLUSÃO	45
REFERÊNCIAS	47

CAPÍTULO 1

Óleos essenciais no controle de *Rhizopus stolonifer* e *Botrytis cinerea*

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO GERAL

O morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.) pertencente à família das Rosáceas, sendo uma cultura de grande importância econômica e que se adapta a diferentes condições ambientais. O morango é produzido e apreciado nas mais variadas regiões do mundo devido ao seu sabor, propriedades nutritivas e rentabilidade (HANCOCK, 1999).

De acordo com os dados da *Food and Agriculture Organization* – FAO (FAO, 2013), a produção mundial de morangos é liderada pela China, responsável por uma produção de aproximadamente 3 milhões de toneladas, seguido dos Estados Unidos, com 1,3 milhões de toneladas. No mercado brasileiro estima-se que a produção anual seja de 130 mil toneladas e área plantada de 4.000 hectares. Segundo o Instituto Brasileiro de Frutos (IBRAF, 2012), Minas Gerais é o maior produtor nacional de morangos com cerca de 40.000 toneladas/ano, seguido dos estados de São Paulo com 29.000 toneladas/ano, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, Espírito Santo e Rio de Janeiro, respectivamente (ANTUNES et al., 2010).

O interesse no consumo do morango e o aumento das áreas cultivadas estão associados ao seu sabor agradável, aroma, coloração e textura como também aos seus nutrientes, minerais, vitaminas e compostos antioxidantes (GALLI et al., 2015). No entanto, a comercialização e a disponibilidade de morangos são restritas devido à rápida deterioração dos frutos, causada pela senescência e doenças pós-colheita, com uma vida útil estimada em três a sete dias sob condição ambiente (HENZ et al., 2008).

Os danos causados pelos fitopatógenos podem estar presentes em todos os estágios da cultura, atacando desde a muda recém-plantada até os frutos na fase final de produção. Dentre as principais doenças que comprometem a qualidade e quantidade do morango na pós-colheita estão os fungos causadores de podridões, que diminuem sua vida de prateleira, prejudicando seu comércio e consumo, tais como o mofo cinzento, causado por *Botrytis cinér*; e a podridão mole, causado por *Rhizopus stolonifer* (BAUTISTA-BANOS et al., 2003; CANTILLANO; SILVA, 2010).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2016) publicou no Relatório do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos de Alimentos que a cultura do morangueiro foi uma das culturas agrícolas que apresentaram maiores resíduos de agrotóxicos. O morango foi um dos alimentos com maior número de amostras contaminadas, sendo que 63,4% das amostras apresentavam teores de resíduos de defensivos acima do

permitido, além do uso de defensivos não autorizados para a cultura. Isso se deve porque os produtores adotam medidas de controle que, na maioria das vezes, resumem-se ao uso de produtos químicos. Esse, por sua vez, pode ser realizado de maneira abusiva e indiscriminada, gerando poluição ambiental e seleção de patógenos resistentes a esses produtos (FRANZENER et al., 2007). Além disso, é desrespeitado o período de carência dos produtos, a fim de obter um fruto com boa aparência na prateleira.

Portanto, para reduzir o uso de produtos químicos no controle de doenças em frutos pós-colheita obtendo frutos mais saudáveis, vários métodos alternativos vem sendo testados, como o biocontrole, atmosfera controlada e modificada, armazenamento refrigerado, indução de resistência, uso de óleos essenciais e de extratos vegetais (MAZARO et al., 2007).

Diversos trabalhos mostram o potencial de óleos essenciais de plantas no controle de fitopatógenos, tanto por sua ação fungitóxica direta, inibindo o crescimento micelial e a germinação de esporos, quanto pela capacidade de induzir o acúmulo de fitoalexinas, indicando a presença de moléculas com característica eliciadora (PEREIRA et al., 2012).

Desta forma, é necessária a busca por métodos alternativos de controle de doenças que causem menos impacto ao meio ambiente e sejam eficientes no manejo de doenças. Algumas plantas, por apresentarem uma diversidade de substâncias em sua composição, muitas vezes com potencial fungicida ou fungistático, devem ser estudadas para serem utilizadas diretamente pelo produtor, bem como servir de matéria-prima para síntese de novos fungicidas (CELOTO et al., 2008).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

A cultura do morangueiro apresenta grande importância econômica devido a sua alta rentabilidade por área quando comparada a outras culturas, independentemente da finalidade a que se destina - se para indústria ou para o consumo *in natura*. Além disso, movimenta diversos outros setores, como insumos, mudas, transportes, embalagens e indústrias processadoras do morango. O fruto destaca-se também devido às suas propriedades nutritivas e sabor agradável, o fazendo muito apreciado em quase todo o mundo (HANCOCK, 1999).

O morango é colhido do final do outono a meados da primavera e atinge cotações elevadas pelo fato de, normalmente, não encontrar grandes concorrências com outros frutos nessa época do ano (RONQUE, 1998; LIMA, 1999). O fotoperíodo e a temperatura afetam diretamente a cultura do morangueiro. A temperatura diurna é um fator crítico à frutificação. Quando elevada, os frutos formados apresentam pouco sabor, alta acidez e são pouco firmes, sendo a temperatura ideal no início da manhã a de 10°C. O fotoperíodo influencia no florescimento. Dias curtos induzem a fase reprodutiva enquanto dias longos induzem a vegetativa. A adaptação das cultivares está intimamente relacionada a esses dois fatores, *temperatura e fotoperíodo*, e o decréscimo de ambos causam o estímulo ao florescimento e frutificação (FILGUEIRA, 2008).

O morangueiro apresenta um fruto de alta perecibilidade e não climatérico, necessitando ser colhido na sua máxima maturação para que atinja as características desejadas de cor, textura e aroma (HERNÁNDEZ-MUNÓZ et al., 2008). Sua alta perecibilidade em pós-colheita é devida, principalmente, à sua intensa atividade metabólica e por possuir alto teor de água e nutrientes, o que o torna um substrato ideal ao ataque de agentes patogênicos causadores de podridões, além de danos mecânicos causados pelo seu transporte e colheita (MALGARIM et al., 2006). Para o morango, a pós-colheita é um dos maiores desafios, e assim é imprescindível criar alternativas que elevem a vida de prateleira, que é muito curta devido às características intrínsecas ao próprio fruto.

A conservação pós-colheita de morangos frescos é muito complexa devida à sua alta atividade metabólica, em especial sua alta taxa de respiração (50-100 mL de CO₂ por Kg por hora a 20°C). As perdas durante o armazenamento podem atingir até 40%. Uma das técnicas mais eficientes para aumentar a vida útil dos frutos é o armazenamento a baixa temperatura. A refrigeração é utilizada para diminuir a taxa respiratória e a perda de água e retardar o amadurecimento e senescência dos frutos (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

Um impedimento para a produção de morangos no país é a grande incidência de doenças e pragas, resultando em várias aplicações de defensivos agrícolas, levando a problemas quanto ao acúmulo de resíduos no ambiente, nos frutos comercializados e para os aplicadores. Dentre as principais doenças que podem deteriorar o fruto e causar perdas acentuadas em pós-colheita estão os fungos *Botrytis cinerea* e *Rhizopus stolonifer* (COSTA; VENTURA, 2006).

O mofo cinzento é causado pelo fungo *Botrytis cinerea* Pers. & F., anamorfo de *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel (MAAS, 1998). A doença causada é conhecida por “mofo cinzento” devido ao bolor cinza característico formado sobre as lesões causadas nos frutos. É considerada a principal doença em pós-colheita do morango (HERNÁNDEZ-MUÑOZ et al., 2008). O fungo causa uma diminuição da vida de prateleira dessa infrutescência, estimada em torno de cinco dias (HENRIQUE; CEREDA, 1999).

O fungo é de ocorrência mundial, necrotrófico e incide em mais de 200 espécies de plantas, infectando todos os órgãos da planta na maioria dos estádios de desenvolvimento. Possui alta variabilidade genética, podendo adquirir resistência facilmente a princípios ativos de fungicidas (HELBIG, 2001; WILLIAMSON et al., 2007).

Condições que favorecem o mofo cinzento são: o excesso de fertilização nitrogenada; irrigação por aspersão; alta umidade; espaçamentos adensados; manutenção de folhas e frutos doentes; chuvas frequentes; danos na colheita; e temperaturas amenas entre 18 °C e 23°C (COSTA et al., 2003).

A infecção acontece por ferimentos e durante a colonização as células infectadas são desintegradas por ação de enzimas do patógeno, dando origem a podridões e manchas. Os sintomas em frutos verdes são caracterizados pela presença de pequenas lesões castanhas levemente depressivas. Nos frutos maduros, as lesões tornam-se recobertas por um crescimento acinzentado constituído por estruturas reprodutivas do patógeno, que rapidamente tomam toda superfície do fruto. Com o progresso da doença, os frutos podem apodrecer completamente ou ainda tornar-se mumificados (HELBIG, 2001).

A disseminação da doença ocorre principalmente pela ação do vento, água de chuva e irrigação, bem como durante o processo de colheita. O fungo tem uma fase de infecção latente nos frutos, o que faz com que frutos aparentemente sadios na colheita sejam afetados pela podridão durante o período de pós-colheita.

As medidas de controle baseiam-se no uso de cultivares mais resistentes ao patógeno, com morangos firmes e resistentes ao manuseio de colheita e a limpeza e destruição semanal

de folhas, flores e frutos com sintomas. Há também o uso de controle biológico e de aplicações de fungicidas registrados e indicados para a cultura (DIAS et al., 2007).

A podridão mole causada pelo fungo *Rhizopus stolonifer* é uma típica doença de pós-colheita. É um patógeno não especializado no seu hospedeiro, podendo ocorrer em um grande número de plantas e sendo altamente destrutível com grande capacidade saprofítica. Na maior parte dos casos, ocorre devido a ferimentos causado nos frutos e pela suscetibilidade dos tecidos vegetais durante o processo de amadurecimento (COSTA; VENTURA, 2006).

A origem da infecção ocorre devido aos frutos conterem, na sua superfície, o inóculo (esporos do fungo). Os sintomas são muito característicos: os frutos maduros se apresentam com um aspecto semelhante à podridão mole, aquosa, com o suco escorrendo para fora, geralmente não se manifestam em frutos imaturos e raramente são vistos no campo (REZENDE; FANCELLI, 1997). Os frutos infectados apresentam alterações na cor e na consistência e posteriormente verifica-se sobre eles um crescimento micelial denso e branco, entremeado com esporângios e esporangióforos escuros (TANAKA et al., 1997). A podridão mole pode se disseminar rapidamente pelo contato do suco que escorre dos frutos infectados para os sadios dentro das embalagens.

A característica primordial do *Rhizopus stolonifer* é o crescimento abundante a 25°C, sendo o esporângio primeiramente branco, havendo mudança para preto no amadurecimento (PITT; HOCKING, 1997). O crescimento a 5°C e 37°C é fraco ou ausente.

Como medidas de controle, recomendam-se cuidados para não causar ferimentos nos frutos durante o processo de colheita, transporte e comercialização. Recomenda-se também não embalar os frutos molhados e mantê-los refrigerados.

No banco de dados do Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários do Ministério da Agricultura (AGROFIT, 2017) encontram-se registrados fungicidas apenas para o controle do *Botrytis cinerea* para a aplicação na cultura do morangueiro, porém apenas em pré-colheita. A inexistência de produtos registrados para mofo-cinzento em pós-colheita e podridão mole em pré e pós-colheita aliado à rápida perecibilidade do pseudofruto apresenta-se como problema para produtores, culminando com o uso incorreto de defensivos.

Dessa forma, uma das tendências atuais é a substituição dos defensivos por tratamentos alternativos que aliem segurança alimentar com sustentabilidade da agricultura e que seja eficiente no controle de doenças.

Apresentam-se como uma possibilidade a exploração da atividade biológica de compostos naturais biologicamente ativos de óleos essenciais presentes em plantas medicinais, condimentares, ornamentais e florestais, que na natureza desempenham a função

de proteção contra fungos, bactérias, vírus, insetos e também contra o ataque de herbívoros, ou, ainda, como indutores de resistência.

Além disso, os óleos essenciais possuem baixa toxicidade para mamíferos, são biodegradáveis, não persistentes no ambiente, apresentam relativo baixo custo de produção, além de apresentarem atividade inseticida e fungicida (ISMÁN, 2000).

As plantas medicinais e aromáticas, de modo geral, têm, em sua composição, substâncias capazes de exercer funções importantes na interação planta-patógeno, seja por ação fungitóxica (PINTO et al., 2010), bactericida (LUCAS, 2009) ou pela indução de respostas de defesa da planta (LUCAS et al., 2012; MEDEIROS et al., 2009), por meio da produção de fitoalexinas, aumento da atividade de PRPs e da síntese de outros compostos bioquímicos e estruturais de defesa da planta (LUCAS et al., 2012; SCHWAN-ESTRADA et al., 2003).

Os óleos essenciais são originados do metabolismo secundário das plantas e possuem composição química complexa, podendo ultrapassar 300 componentes químicos diferentes, destacando-se a presença de terpenos e fenilpropanóides. Constituem elementos voláteis contidos em muitos órgãos vegetais e estão relacionados com diversas funções necessárias a sobrevivência (SIANI et al., 2000).

As substâncias naturais obtidas de extratos vegetais e óleos essenciais, além de ter como vantagem o fato de não oferecer riscos à saúde humana e não promover a contaminação ambiental, são promissoras no controle de doenças em várias culturas e uma alternativa ao uso de agrotóxicos. Diversos trabalhos relatam a eficiência de óleos essenciais na inibição de fitopatógenos e no controle de importantes doenças em plantas.

Abreu (2006), testando óleos essenciais de canela (*Cinnamomum zeylanicum*), capim-limão (*Cymbopogon citratus*), cravo (*Syzygium aromaticum*), eucalipto (*Eucalyptus citriodora*), tea-tree (*Melaleuca alternifolia*), palmarosa (*Cymbopogon Martini*) e menta (*Mentha piperita*), mostrou o efeito desses óleos, tanto em condições *in vitro* como em campo, no controle de *Alternaria solani* em tomateiro.

Segundo Medice et al. (2007), os óleos essenciais de eucalipto (*Eucalyptus citriodora*), citronela (*Cymbopogon nardus*), nim (*Azadirachta indica*) e tomilho (*Thymus vulgaris*) reduziram a intensidade de *Phakospora pachyrizi* em casa de vegetação e reduziram sua germinação *in vitro*.

Os componentes voláteis dos óleos essenciais de eucalipto (*Eucalyptus citriodora*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*), melaleuca (*Melaleuca alternifolia*), menta (*Mentha piperita*), cravo (*Syzygium aromaticum*) e palmarosa (*Cymbopogon Martini*), na concentração

de 1000 ppm, apresentaram de 80 a 59% de controle do crescimento micelial de *Botrytis cinerea* em relação à testemunha, enquanto o óleo de capim limão (*Cymbopogon citratus*) apresentou 100% de inibição (LORENZETTI, et al., 2011).

Em outro trabalho, Fialho et al. (2015) testaram 16 óleos essenciais para o controle da ferrugem da uva, *Phakopsora euvitis*. Os óleos essenciais de canela (*Cinnamomum zeylanicum*), citronela (*Cymbopogon winterianus*), nim (*Azadirachta indica*) e tomilho branco (*Thymus vulgaris*), na concentração de 1%, reduziram significativamente a severidade da ferrugem em videira cv. Benitaka em condições de campo.

A atividade antifúngica do óleo essencial de gerânio (*Pelargonium graveolens*) e artemísia (*Artemisia arborescens*) foi avaliada contra *Rhizoctonia solani*, e os resultados mostraram que ambos os óleos essenciais eram altamente ativos na dose de 12,5 µl / 20 mL. Além disso, o efeito inibitório do óleo essencial de *P. graveolens* foi evidenciado como mais forte do que o do óleo de *A. arborescens* para todas as doses testadas (BOUZENNA; KRICHEN, 2013).

Wilson et al. (1997) verificaram que o óleo essencial de capim limão (*Cymbopogon citratus*) inibiu totalmente a germinação de esporos de *Botrytis cinerea*, até mesmo em baixas concentrações.

Componentes voláteis presentes nos óleos essenciais de tomilho (*Thymus vulgaris*), mostraram inibição total do crescimento de *Botrytis cinerea* e *Alternaria arborescens* (PLOTTO et al., 2003).

Assim, a busca de métodos de controle alternativo, como a exploração da atividade biológica de compostos secundários presentes em plantas medicinais, torna-se necessária para atender as normas de qualidade do mercado externo, principalmente em relação à substituição e/ou diminuição do uso de produtos químicos por produtos biológicos (ROZWALKA, 2006).

REFERÊNCIAS

- ABREU, C. L. M. **Controle de *Alternaria solani* em tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) com óleos essenciais**. 71 f. Tese (Doutorado em Agronomia - Horticultura) – UNESP – FCA Faculdade Ciências Agrônômicas. Botucatu, 2006.
- AGROFIT: Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, **Coordenação Geral de Agrotóxicos e Afins**. Disponível em <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: janeiro de 2017.
- ANTUNES, L. E. C.; RISTOW, N. C.; KROLOW, A. C. R.; CAPENEDO, S.; REISSER JÚNIOR, R. N. C. Yield and quality of strawberry cultivars. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 2, p. 222 -226, 2010.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA). **Relatório de atividades de 2016**. Brasília, 2016.
- BAUTISTA-BANOS, S.; GARCIA, E.; BARREIRA, L.; REYES, N.; WILSON, C. Seasonal evaluation of the postharvest fungicidal activity of powders and extracts of huamuchil (*Pothecelloium dulce*): action against *Botrytis cinerea*, *Penicillium digitatum* and *Rhizopus stolonifer* of strawberry fruit. **Postharvest Biology and Technology**. Washington. V 29. N. 1, p. 81-92, 2003.
- BOUZENNA, H.; KRICHEN, L. *Pelargonium graveolens* L'Her. and *Artemisia arborescens* L. essential oils: Chemical composition, antifungal activity against *Rhizoctonia solani* and insecticidal activity against *Rhysopertha dominica*. **Natural Product Research**. V 27, 2013.
- CANTILLANO, R.F.F.; SILVA, M.M. Manuseio pós-colheita de morangos. Embrapa Clima Temperado. Documentos, 318. Pelotas: **Embrapa Clima Temperado**; p.36, 2010.
- CELOTO, M. I. B.; PAPA, M. F. S.; SACRAMENTO, L. V. S.; CELOTO, F. J. Atividade antifúngica de extratos de plantas a *Colletotrichum gloeosporioides*. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 30, n. 1, p. 1-5, 2008.
- CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio**. 2. Ed. Lavras: UFLA, p 785. 2005.
- COSTA, H.; VENTURA, J. A. Doenças do morangueiro: diagnóstico e manejo. In: BALBINO, J. M. S. (Ed.). **Tecnologias para produção, colheita e pós-colheita de morangueiro**. Vitória: Incaper, p. 41-57, 2006.
- COSTA, H.; ZAMBONI, L.; VENTURA, J. A. Manejo Integrado das Doenças do Morangueiro. In: ZAMBONI, L., (Ed.). **Produção Integrada Fruteiras Tropicais**, Viçosa, p. 131-164, 2003.
- DIAS, M. S. C.; COSTA, H.; CANUTO, R. S. Manejo de doenças do morangueiro. In: **Informe Agropecuário**. Belo Horizonte, v.28, p.64-77. 2007.

FIALHO, R. O.; PAPA, M. F. S.; PEREIRA, D. A. S. Efeito fungitóxico de óleos essenciais sobre *Phakopsora euvtis*, agente causal da ferrugem da videira. **Plant Pathology**, São Paulo, v.82, p. 1-7, 2015.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo Manual de Olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. São Paulo: UFV, p. 421, 2008.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. FAOSTAT: Agricultural Production/strawberry. 2013. Available

FRANZENER, G.; MARTINEZ-FRANZENER, A. da S.; STANGARLIN, J. R.; CZEPAK, M. P.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; CRUZ M. E. S. Atividades antibacteriana, antifúngica e indutora de fitoalexinas de hidrolatos de plantas medicinais. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 28, p. 29-38, jan./mar. 2007.

GALLI, V.; BOROWSKI, J. M.; PERIN, E. C.; MESSIAS, R. S.; LABONDE, J.; PEREIRA, I. S.; ANJOS - SILVA, S. D.; ROMBALDI, C. V. Validation of reference genes for accurate normalization of gene expression for real time-quantitative PCR in strawberry fruits using different cultivars and osmotic stresses. **Gene**, California, v. 554, p. 205-214, 2015.

HANCOCK, J. F. Strawberries. **CABI Publishing**. Wallingford, Reino Unido, p. 393, 1999.

HELBIG, J. Biological Control of *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr. in Strawberry by *Paenibacillus polymyxa* (Isolate 18191). **Journal of Phytopathology**, Berlim, v.149, p. 265-273, 2001.

HENRIQUE, C. M.; CEREDA, M. **Utilização de biofilmes na conservação pós-colheita de morango (*Fragaria Ananassa Duch*)** cv IAC Campinas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 19, n. 2, p. 231-233, 1999.

HENZ, G.P.; REIS, A.; SILVA, K.C.C.; PEREIRA, S.F. Incidência de doenças de pós-colheita em frutos de morango produzidos no Distrito Federal. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, 45. Brasília: Embrapa Hortaliças; p. 13, 2008.

HERNANDEZ-MUÑOZ, P.; ALMENAR, E.; DEL VALLE, V.; VELLEZ, D.; GALVARA, R. Effect of chitosan coating combined with postharvest calcium treatment on strawberry (*Fragaria ananassa*) quality during refrigerated storage. **Food Chemistry**, v. 110, p. 428-435. 2008

IBRAF – Instituto Brasileiro de Frutas. **Panorama da cadeia produtiva das frutas em 2012 e projeções para 2013**. Brasília, DF, 2012, 127 p

ISMAN, M. B. Plant essential oils for pestand disease management. **Crop Protection**, v.19, p.603-8, 2000.

LIMA, L. C. O. Qualidade, colheita e manuseio pós-colheita de frutos de morangueiro. **Informe Agropecuário**. Morango: tecnologia inovadora, Belo Horizonte, v.20, n.198, p.80-83, maio/jun. 1999.

LORENZETTI, E. R.; MONTEIRO, F. P.; SOUZA, P. E.; SOUZA, R. J.; SCALICE, H. K.; DIOGO JR, R.; PIRES, M.S.O. Bioatividade de óleos essenciais no controle de *Botrytis*

cinerea isolado de morangueiro. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, Botucatu, v.13, especial, p.619-627, 2011.

LUCAS, G. C. **Óleos essenciais no controle da mancha bacteriana do tomateiro**. 2009. 93 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

LUCAS, G. C.; ALVES, E.; PEREIRA, R. B.; ZACARONI, A. B.; PERINA, F. J.; SOUZA R. M. Indian clove essential oil in the control of tomato bacterial spot. **Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v. 94, n. 1, p. 45-51, Jan. 2012

MAAS, J. L. (Ed) **Compendium of strawberry diseases**. 2ª Ed., St. Paul: The American Phytopathological Society. p. 98, 1998.

MALGARIM, M. B.; CANTILLANO, R. F. F., COUTINHO, E. F. Sistemas e condições de colheita e armazenamento na qualidade de morangos cv. Camarosa. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 28, n. 2, p. 185-189, 2006.

MAZARO, S. M. **Indução de resistência à doenças em morangueiro pelo uso de elicitores**. Tese (Doutorado) apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal. Curitiba, 2007.

MEDEIROS, F. C. L.; RESENDE, M. L. V.; MEDEIROS, F. H. V.; ZHANG, H. M.; PARÉ, P. W. Defense gene expression induced by a coffee-leaf extract formulation in tomato. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 74, n. 2, p. 175-783, Apr. 2009

MEDICE, R.; ALVES, E.; ASSIS, R.T.; MAGNO-JUNIOR, R.G. & LOPES, H.A.G.L. Óleos essenciais no controle da ferrugem asiática da soja *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd. **Ciência e Agrotecnologia** 31: p. 83-90, 2007.

PEREIRA, R. B.; LUCAS, G. C.; PERINA, F. J.; RIBEIRO JR, P. M. R.; ALVES, E. Óleo essencial de citronela no controle e na ativação de respostas de defesa do cafeeiro contra a ferrugem e cercosporiose. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 36, n. 4, p. 383-390, 2012.

PINTO, J. M. A.; SOUZA, E. A.; OLIVEIRA, D. F. Use of plant extracts in the controle of common bean anthracnose. **Crop Protection**, Guildford, v. 29, n. 8, p. 838-842, Aug. 2010

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**, 2ª ed. London: Blackie Academic and Professional, p. 593. 1997.

PLOTTO, A.; ROBERTS, D. D.; ROBERTS, R. G. Evaluation of plant essential oils as natural postharvest disease control of tomato (*Lycopersicon esculentum*). **Acta Horticulturae**, v. 628, p. 737-45, 2003.

REZENDE, J. A. M.; FANCELLI, M. I. Doenças do mamoeiro (*Carica papaya L.*). In: KIMATI et al. **Manual de Fitopatologia**. 3ª Ed. São Paulo: Ceres. v. 2, cap. 46, p. 486-496. 1997.

ROZWALKA, L. C. **Controle alternativo da antracnose em frutos de goiabeira, em laboratório**. 2006. 56p. Dissertação (Mestrado Produção Vegetal) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

RONQUE, E. R. V. **A cultura do morangueiro: revisão e prática.** Curitiba: EMATER Paraná, p. 206, 1998.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. Potencial de extratos e óleos essenciais de vegetais como indutores de resistência: plantas medicinais. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 29, n. 1, p. 124-125, jan./mar. 2003.

SIANI, A. C. et al. Óleos essenciais: potencial antiinflamatório. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento.** Brasília, v. 16, p. 38-43, 2000.

TANAKA, M. A. S.; BETTI, J. A.; KIMATI, H. Doenças em Morangueiro. **Manual de Fitopatologia: Doenças de Plantas Cultivadas.** Ed. Agronomica Ceres, São Paulo v. 2, p. 556-571. 1997.

WILLIAMSON, B.; TUDZYNSKI, B.; TUDZYNSKI, P.; VAN KAN, J. A. L., *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. **Molecular Plant Pathology**, v. 8, 561-580, 2007.

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

CAPÍTULO 2

EFEITO DE ÓLEOS ESSENCIAIS E DO COMPONENTE TRANS-ANETHOLE SOBRE *Botrytis cinerea* E *Rhizopus stolonifer* EM MORANGOS

RESUMO

Este trabalho relata um estudo sobre o efeito protetor dos voláteis de óleos essenciais de *Foeniculum vulgare* var. *Dulce*, *Litsea cubeba*, *Pelargonium graveolens* e *Eucalyptus citriodora* contra *Botrytis cinerea* e *Rhizopus stolonifer*, fungos de podridão pós-colheita em morangos. Os óleos que apresentaram os melhores efeitos antifúngicos tanto para o crescimento micelial como para a germinação conidial de *B. cinerea* e *R. stolonifer in vitro* foram os óleos essenciais de *Litsea cubeba* e *Foeniculum vulgare* var. *dulce*. *In vivo* o óleo essencial de *Litsea cubeba* promoveu um controle parcial apresentando formação de estruturas fúngicas, já o óleo de *Foeniculum vulgare* var. *dulce* e seu componente majoritário trans-anethole apresentou 100% de controle em frutos de morango. A análise química por GC-MS mostra que os componentes principais dos óleos de *Litsea cubeba*, *Foeniculum vulgare* var. *dulce*, *Pelargonium graveolens* e *Eucalyptus citriodora* foram geranial 32,03%, trans-anetole 48,81%, citronelol 24,94% e citronelal 54,74%, respectivamente.

Palavras chave: Pós-colheita. Óleos essenciais. *Foeniculum vulgare* var. *dulce*. *B. cinerea*. *R. stolonifer*.

ABSTRACT

This work report a study on the protective effect of volatiles of essential oils of *Foeniculum vulgare* var. *dulce*, *Litsea cubeba*, *Pelargonium graveolens* and *Eucalyptus citriodora* against *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifera* - post-harvest rot fungi on strawberries. The oils that showed the best antifungal effects for both mycelial growth and conidial germination of *B. cinerea* and *R. stolonifer* *in vitro* were the essential oils of *Litsea cubeba* and *Foeniculum vulgare* var. *dulce*. *In vivo* the essential oil of *Litsea cubeba* promoted a partial control presenting formation of fungal structures, already the oil of *Foeniculum vulgare* var. *dulce* and its major component trans-anethole presented 100% control in strawberry fruits. Chemical analysis by GC-MS shows that the major components of *Litsea cubeba* oils, *Foeniculum vulgare* var. *dulce*, *Pelargonium graveolens* and *Eucalyptus citriodora* were geranial 32.03%, trans-anethole 48.81%, citronellol 24.94% and citronellal 54.74%, respectively.

Keywords: Post-harvest. Essencial oils. *Foeniculum vulgare* var. *dulce*. *B. cinerea*. *R. stolonifer*.

1 INTRODUÇÃO

Morangos são apreciados como fruta e também compõem muitos pratos em todo o mundo. Com base no último censo feito pela Organização de Alimentação e Agricultura da Divisão de Estatística das Nações Unidas (FAO, 2013), as maiores áreas encontradas ocupadas com morangos em ordem decrescente são China (110.490 ha), Polônia (55020 ha), Federação Russa (27.000 ha), Estados Unidos da América (23.549 ha) e Alemanha (15.577 ha). Os cinco principais produtores são China (3.005.304 t), Estados Unidos da América (1.360.869 t), México (379.464 t), Turquia (372.498 t) e Espanha (312.500 t). Em contraste, os países que têm os rendimentos mais elevados são Estados Unidos da América (57,79 t / ha), México (44,66 t / ha), Grécia (44,28 t / ha), Egito (42,28 t / ha) e Costa Rica (40,46 t / ha).

Esta discordância entre a área, produção e produtividade nesses países pode ser atribuída a doenças, tais como o mofo cinzento, que se tornam mais expressiva em condições de pós-colheita. Para superar as perdas devido ao crescimento do fungo, táticas como o controle alternativo podem garantir a boa qualidade dos morangos na prateleira do supermercado.

Um impedimento para a produção de morangos é a grande incidência de doenças e pragas, resultando em várias aplicações de defensivos agrícolas. Estes são, na maioria das vezes, utilizados de maneira incorreta e excessiva, levando a problemas quanto ao acúmulo de resíduos no ambiente, nos frutos comercializados e para os aplicadores, além de resistência de fungos a determinados princípios ativos (GHINI; KIMATI, 2002). Dentre as principais doenças que podem afetar o fruto na pós-colheita estão o mofo cinzento, causado pelo fungo *Botrytis cinerea*, e a podridão mole, causada pelo fungo *Rhizopus stolonifer* (BAUTISTA-BANOS, et al., 2003; CANTILLANO et al., 2010).

A ênfase em proteção de frutos na pós-colheita contra podridões tem sido desviada do uso de produtos químicos para várias técnicas alternativas de controle que garantem a segurança do produto e que não colocam em risco a saúde dos consumidores, minimizando ou substituindo o uso de fungicidas e prolongando o período de conservação dos frutos.

O conhecimento sobre os efeitos indesejáveis do uso de fungicidas convencionais, associado à preocupação de órgãos reguladores e consumidores quanto à qualidade dos alimentos e o aumento da demanda por produtos rastreáveis e de maior qualidade, tem estimulado a busca por novas alternativas para o controle de doenças de plantas.

Assim, o emprego de produtos alternativos mostra-se como uma opção viável. Dentre estes produtos, enquadram-se os óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas (STANGARLIN, 2007). Diversos trabalhos mostram o potencial de óleos essenciais de plantas no controle de fitopatógenos, tanto por sua ação fungitóxica direta, inibindo o crescimento micelial e a germinação de esporos, quanto pela capacidade de induzir o acúmulo de fitoalexinas indicando a presença de moléculas com característica eliciadora (PEREIRA et al., 2012).

A atividade antifúngica in vitro do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* sobre *Botrytis cinerea* foi avaliada por Bishop & Thornton (1998). Foi verificado que o óleo nas concentrações de 1,6 a 3,2% reduziu o crescimento de *B. cinerea* em folhas de repolho. Na maior concentração, a inibição foi semelhante ao dos fungicidas benomyl, carbendazin, metalaxyl e iprodione.

Medice et al. (2007) avaliaram o potencial dos óleos de *Corymbia citriodora* (eucalipto citriodora), *Cymbopogon nardus* (citronela), *Azadirachta indica* (nim) e *Thymus vulgaris* L (tomilho) nas concentrações 1%, 0,5%, 1% e 0,3%, respectivamente para cada óleo, na inibição da germinação de uredinósporos de *Phakospora pachyrhizi* e na redução da severidade dos sintomas em casa-de-vegetação. Os autores constataram que os óleos inibiram 100% a germinação dos uredinósporos. Todos os óleos retardaram a evolução da doença quando comparados com a testemunha, observando uma redução na severidade em média de 34 a 62,3%.

Os componentes voláteis dos óleos essenciais de eucalipto (*Eucaliptus citriodora*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*), melaleuca (*Melaleuca alternifolia*), menta (*Mentha piperita*), cravo (*Syzygium aromaticum*) e palmarosa (*Cymbopogon Martini*), na concentração de 1000 ppm, apresentaram de 59 a 80% de controle do crescimento micelial de *Botrytis cinerea* em relação à testemunha, enquanto o óleo de capim limão (*Cymbopogon citratus*) apresentou 100% de inibição (LORENZETT, et al., 2011).

A atividade antifúngica do óleo essencial de *Pelargonium graveolens* e *Artemisia arborescens* foi avaliada contra *Rhizoctonia solani* e os resultados mostraram que ambos os óleos essenciais eram altamente ativos na dose de 12,5 µL / 20 mL. Além disso, o efeito inibitório do óleo essencial de *P. graveolens* foi evidenciado como mais forte do que o do óleo de *A. arborescens* para todas as doses testadas (BOUZENNA, H; KRICHEN, L, 2013)

Desta forma, conduziu-se este estudo, com o objetivo de verificar o efeito dos compostos voláteis de óleos essenciais no controle de *Rhizopus stolonifer* e *Botrytis cinerea* em morangos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Local de realização dos experimentos

Este estudo foi conduzido no Laboratório de Epidemiologia do Departamento de Fitopatologia (DFP), e na Central de Análise e Prospecção Química do Departamento de Química (DQI), ambos na Universidade Federal de Lavras (UFLA).

2.2 Obtenção dos isolados e óleos essenciais

Para este experimento, foi utilizado um isolado de *Botrytis cinerea* (CML 2317), pertencente à Coleção de Culturas da Micoteca do Laboratório de Micologia, e o fungo *Rhizopus stolonifer*, que foi isolado de frutos de morangos adquiridos no comércio local de Lavras – MG, identificado e purificado.

De um total de 19 óleos essenciais comprados, os óleos de *Salvia sclarea* e *Vetiveria zizanoides* foram extraídos no Brasil e comprados da empresa BioEssência. O restante dos óleos essenciais foi comprado da empresa Ferquima e extraídos de vários locais do mundo: *Amyris balsamifera* (Haiti), *Boswellia carterii* (Somália), *Cupressus sempervirens* (Espanha), *Cananga odorata* (Madagascar), *Cedrus atlantica* (Marrocos), *Citrus reticulata* var. *tangerine* (Brasil), *Citrus aurantium* var. *amara* (Brasil), *Citrus aurantium* var. *dulce* (Brasil), *Copaifera officinalis* (Brasil), *Eucalyptus citriodora* (Brasil), *Eucalyptus staigeriana* (China), *Foeniculum vulgare* var. *dulce* (Espanha), *Juniperus communis* (Croácia), *Litsea cubeba* (China), *Origanum majorana* (Egito), *Pelargonium graveolens* (Egito), *Pogostemon cablin* (Indonésia).

2.3 Pré - seleção dos óleos essenciais

Primeiramente foi testado o efeito dos compostos voláteis dos 19 óleos essenciais, citados acima, sobre os fungos *Rhizopus stolonifer* e *Botrytis cinerea*, para depois selecionar os quatro melhores óleos para serem usados nos demais testes.

O experimento foi conduzido em placas de Petri com 90 mm de diâmetro, onde no centro da placa foi depositado o micélio dos fungos *B. cinerea* e *R. stolonifer* sobre o meio de cultura Batata-Dextrose-Agar (BDA). Na parte superior da placa, foi colocado papel filtro autoclavado, no qual foi aplicado 1 mL da solução contendo óleo essencial na concentração

de 1%. As placas foram vedadas com filme plástico e incubadas a 25°C. O experimento contou com três repetições de cada tratamento.

As avaliações consistiram em medições diárias do diâmetro das colônias por meio de régua milimétrica. As avaliações iniciaram-se 24 horas após a incubação e foram encerradas quando o crescimento micelial do tratamento testemunha atingiu toda a superfície do meio.

2.4 Determinação da composição química

A análise da composição química foi feita em triplicado. As análises quantitativas foram realizadas por cromatografia acoplada a um detector de ionização de chama de hidrogénio (GC-FID) e sistema Agilent® 7890A equipado com uma coluna capilar de sílica fundida de fase gasosa HP-5 (30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interior x 0,25 mm de espessura filme). Utilizou-se hélio como veículo a um caudal de 1,0 mL / min. As temperaturas de injeção e de detecção foram mantidas a 220 ° C e 240 ° C, respectivamente.

A temperatura inicial do forno foi de 40 ° C seguida por uma rampa de temperatura de 3 ° C / min até 200 ° C e 10 ° C / min até 250 ° C. Diluiu-se o óleo essencial com acetato de etilo a 1% e injetou-se 1 uL no cromatógrafo utilizando o modo de divisão a 1:50. A análise quantitativa foi obtida integrando o cromatograma de íons totais e o conteúdo dos constituintes eluídos expressos em percentagem da área relativa do pico. As análises qualitativas foram feitas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS) com um Agilent® 5975C. Isso é operado em modo de varrimento por ionização de impacto eletrônicas a 70 eV à velocidade de 1,0 scan / s e intervalo de aquisição de massa de 40 a 400 m / z. As condições cromatográficas foram idênticas às utilizadas nas análises quantitativas. Os componentes foram identificados pela comparação dos índices de retenção de Kovats (IKc) calculados com os índices de retenção (IK) relatados na literatura (Adams, 2007; Kováts, 1965) e por comparações espectrais de massa. IKc foram calculados pela aplicação da equação de Van Den Dool e Kratz.

2.5 Bioatividade de componentes voláteis de óleos essenciais sobre o crescimento micelial de *B. cinerea* e *R. stolonifer*

No teste de inibição de crescimento micelial dos fungos *B. cinerea* e *R. stolonifer*, foram utilizados os quatro óleos essenciais mais eficazes escolhidos na pré-seleção.

O experimento foi conduzido em placa Petri com 90 mm de diâmetro contendo meio de cultura BDA. Foi depositado no centro de cada placa de Petri o micélio dos fungos *B. cinerea* e *R. stolonifer* (cada patógeno foi inoculado separadamente para não haver competição entre as espécies testadas). Na parte superior da placa, discos de papel filtro de 5 mm de diâmetro autoclavados foram embebidos com 1mL dos óleos essenciais nas concentrações de 0,25, 0,5, 0,75 e 1,0%. Para a testemunha, foi adicionado ao papel filtro autoclavado 1 mL de uma solução de água + tween 80. Em seguida, as placas foram seladas com filme plástico e armazenadas de forma invertida. As placas foram armazenadas a 25°C e fotoperíodo de 12 horas em câmara de crescimento. O experimento teve quatro repetições de cada tratamento.

As avaliações consistiram em medições diárias do diâmetro das colônias por meio de régua milimétrica. As avaliações iniciaram-se 24 horas após a incubação e foram encerradas quando o crescimento micelial, do tratamento testemunha, atingiu toda a superfície do meio.

2.6 Bioatividade de componentes voláteis de óleos essenciais sobre a germinação dos conídios de *B. cinerea* e *R. stolonifer*

Para avaliar a inibição da germinação dos conídios, suspensões de conídios de *B. cinerea* e *R. stolonifer* foram obtidas a partir de colônias em crescimento com esporulação em placas de Petri com meio BDA. Foi feita a deposição de 10 mL de água destilada esterilizada nas placas, em seguida a superfície da colônia foi raspada com Alça de Drigalsky. Após remoção da massa micelial mais conidial, foi feita a filtração em camada dupla de gaze esterilizada, obtendo-se uma suspensão de conídios. A sua concentração foi ajustada para 10^5 conídios/mL através de leitura em Câmara de Neubauer. Foram utilizadas placas de Petri bipartidas, onde em uma das partes continha meio Ágar-água (AA) 2%, no qual foi adicionado 100 µL suspensão de conídios que foram espalhados sobre o meio, e a outra metade com algodão autoclavado no qual foi aplicado 1 mL dos tratamentos descritos no ensaio de crescimento micelial. Depois as placas foram levadas para câmara de germinação a 25°C sob fotoperíodo de 12 h, ao final de 24 horas foi feita a interrupção do processo germinativo utilizando-se lactoglicerol.

A avaliação da porcentagem de inibição da germinação foi realizada contando-se o número de conídios germinados e não germinados em microscópio de luz. Foram considerados conídios germinados os conídios que apresentavam tubo germinativo independentemente do seu tamanho. O experimento teve quatro repetições por tratamento. Foram avaliados 100 conídios por repetição.

2.7 Efeito protetor dos componentes voláteis dos dois melhores óleos essenciais contra *R. stolonifer* e *B. cinerea* em morangos

Para o experimento *in vivo*, os pseudofrutos de morango foram adquiridos no comércio local da cidade de Lavras, Minas Gerais. Neste experimento foram utilizados os dois óleos essenciais que tiveram maior eficiência nos experimentos *in vitro*. A inoculação dos fitopatógenos, *B. cinerea* e *R. stolonifer*, foi realizada a partir de colônias com esporulação, pulverizando-se com uma suspensão aquosa calibrada para 10^5 conídios/mL, até o ponto de escorrimento.

Cada unidade experimental foi constituída de três pseudofrutos acondicionados em caixas plásticas. Os tratamentos foram realizados com a adição de 2 ml da solução contendo o óleo essencial, na concentração de 10%, em algodões fixados na borda das caixas plásticas.

As caixas plásticas foram devidamente fechadas com filme plástico e armazenadas em câmaras de crescimento sob temperatura de 20°C e fotoperíodo de 12 h para o fungo *R. stolonifer*, e sob 5°C e 12h de fotoperíodo para o fungo *B. cinerea*. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com três repetições por tratamento, sendo a parcela composta por três pseudofrutos/caixa.

A variável analisada na pós-colheita foi incidência do patógeno onde os morangos foram avaliados visualmente a olho nu quanto à presença de micélio fúngico, determinando-se o percentual de controle do patógeno. As avaliações foram realizadas quando a caixa do tratamento testemunha tinha sido tomada pelo fungo.

2.8 Efeito protetor dos voláteis do componente majoritário do melhor óleo essencial contra *R. stolonifer* e *B. cinerea* em morangos

Neste experimento, foi utilizado o componente majoritário do óleo essencial que teve maior eficiência nos experimentos *in vivo*. Sua metodologia foi realizada igual ao experimento *in vivo* com os óleos essenciais (item 2.6), mudando somente as concentrações, que foram de 1% e 10%.

2.9 Análises estatísticas

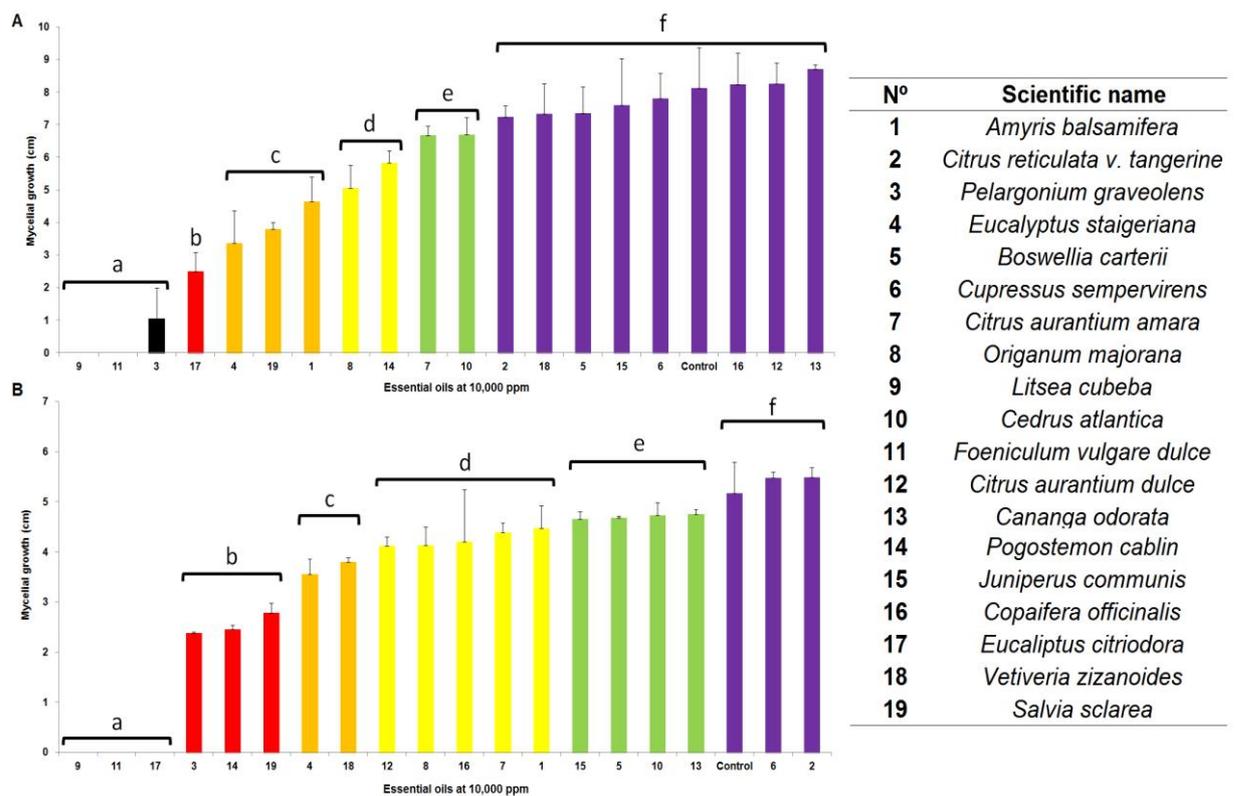
As análises estatísticas foram realizadas em software estatístico Sisvar v. 4.0 (FERREIRA, 2000). Para a comparação de médias qualitativas, utilizou-se o teste Scott-Knott ($p \leq 0,005$).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Seleção dos óleos essenciais

Dentre os 19 óleos essenciais testados para o controle de *R. stolonifer*, quatro deles tiveram eficiência de controle acima de 70%, sendo eles: *Litsea cubeba*, *Foeniculum vulgare* var. *dulce*, *Pelargonium graveolens* e *Eucalyptus citriodora* (Figura 1A). Os óleos de *L. cubeba*, *F. vulgare dulce* e *P. graveolens* controlaram em torno de 88 a 100% do crescimento micelial de *R. stolonifer*. Já o óleo de *E. citriodora* controlou 72,2% do crescimento micelial.

Figura 1 - Efeito dos componentes voláteis dos 19 óleos essenciais testados sobre o crescimento micelial de *R. stolonifer* (A) e *B. cinerea* (B).



Fonte: da autora (2017)

Para o controle de *B. cinerea*, os quatro óleos essenciais com maior eficiência de controle foram: *L. cubeba*, *F. vulgare* var. *dulce*, *E. citriodora* e *P. graveolens* (Figura 1B). Os óleos de *L. cubeba*, *F. vulgare* var. *dulce* e *E. citriodora* apresentaram 100% de controle

do crescimento micelial. O óleo de *P. graveolens* controlou aproximadamente 72,2% do crescimento micelial.

Portanto, como os quatro óleos essenciais mais efetivos, *L. cubeba*, *F. vulgare* var. *dulce*, *P. graveolens* e *E. citriodora*, foram os mesmos para o controle de *R. stolonifer* e *B. cinerea*, estes foram usados para os demais experimentos.

3.2 Análise química dos óleos essenciais selecionados

Na avaliação da composição química dos quatro óleos essenciais em estudo, conforme Tabela 1, pode-se verificar que as espécies contêm números variáveis de constituintes. Apesar da quantidade variável das substâncias, sempre uma ou duas prevalecem em maior quantidade nos óleos essenciais.

Pelos dados descritos, nota-se que foram identificados 25 constituintes no óleo essencial de *L. cubeba*, com predominância do geranial 32,03%, neral 25,86% e limonene 11,58%. Para o óleo essencial de *F. vulgare* var. *dulce* foram identificados 21 constituintes, determinando-se um percentual acima de 98% da composição química do óleo, e os compostos majoritários foram o trans-anethole 48,81%, fenchone 11,92%, limonene 11,87% e α -pinene 8,91%. Na composição volátil do óleo essencial de *P. graveolens*, os compostos majoritários foram citronellol com 24,94% da área total, seguido pelo geraniol 13,56% e citronellyl formate 7,07%. Os principais compostos do óleo essencial de *E. citriodora* foram citronellal, citronellol e isoisopulegol, apresentando respectivamente 54,74%, 9,3% e 6,38%.

Os resultados deste trabalho estão de acordo com Park et al. (2007) que analisaram o óleo comercial de *L. cubeba* e como componentes majoritários encontraram o geranial (39,2%), neral (30,2%) e limonene (14,6%). Este presente trabalho teve como principais componentes os mesmos descritos neste estudo, mudando somente a porcentagem dos componentes químicos.

Shahat et al. (2011) analisaram a composição química dos frutos de *F. vulgare* var. *dulce* e constataram que seu principais componentes foram trans-anethole (46,26%), limonene (27,78%) e fenchone (12,77%). No entanto, a composição do óleo está em conformidade com o relatado. Já Embong et al. (1977) analisaram o óleo comercial de *F. vulgare* var. *dulce* e os resultados foram compatíveis com os que observamos neste trabalho, apresentando como principais componentes: trans-anethole (57.1%), limonene (19,0%) e fenchone (4,3%).

Entre os compostos majoritários comumente encontrados nas cultivares de gerânio, citronelol e geraniol são os mais abundantes, oscilando entre 20 e 60% (PETERSON et al.,

2006). No presente estudo, o óleo essencial de *P. graveolens*, o citronelol, apresentou as maiores porcentagens relativas entre os constituintes majoritários (24,94%).

Batish et al. (2006), por meio de CG-MS, constataram os mesmos componentes majoritários do óleo de *E. citriodora* encontrados neste trabalho: o citronellal (52.2%), citronellol (12.3%), isoisopulegol (11.9%). Olivero-Verbel et al. (2010) analisaram os componentes do óleo essencial de *E. citriodora* e constataram que os principais foram citronellal (40.0%), isopulegol (14.6%) e citronellol (13%). No entanto, a composição do óleo essencial está em conformidade com o relatado até agora em folhas de *E. citriodora*.

Diferenças foram encontradas no número de constituintes e na porcentagem da área relativa dos componentes químicos deste trabalho com os da literatura. Essas diferenças podem estar relacionadas a condições edafoclimáticas e ecológicas, como época de coleta, espaçamento entre plantas e nutrição das plantas.

A presença desses componentes majoritários pode ser responsável pelo efeito fungicida e/ou fungistático dos óleos essenciais, ou ainda ter um conjunto de componentes responsáveis por seus efeitos (SIMÕES et al., 2000).

Desta forma, por meio da cromatografia foi possível identificar os constituintes dos óleos essenciais. Esta é uma etapa essencial para a prospecção de novos produtos naturais recomendados para o manejo de doenças.

Tabela 1 - Constituintes dos melhores 4 óleos essenciais contra *R. stolonifer* e *B.cinerea* identificados por cromatografia gasosa.

Essential oil	Nº	CAS	KI	Calculated KI literature	Tr	Compounds	Similarity	Content (%)	
<i>Litsea cubeba</i>	1	80-56-8	933	939	6.173	α -pinene	96	1.91	
	2	79-92-5	949	953	6.648	Camphene	94	0.51	
	3	3387-41-5	971	976	7.284	Sabinene	96	1.20	
	4	127-91-3	978	980	7.474	β -pinene	96	1.45	
	5	110-93-0	983	985	7.6	5-hepten-2-one,6-Methyl	90	1.77	
	6	127-91-3	987	980	7.734	β -pinene	91	1.39	
	7	138-86-3	1029	1031	9.182	Limonene	97	11.58	
	8	470-82-6	1032	1033	9.291	1.8 cineol	93	2.98	
	9	78-70-6	1100	1098	11.849	Linalool	97	2.47	
	10	106-23-0	1151	1153	14.001	Citronellal	95	1.83	
	11	473-67-6	1161	1165	14.415	Verbenol	85	0.49	
	12	507-70-0	1173	1169	14.96	Borneol	85	0.19	
	13	98-55-5	1197	1189	15.935	α -terpineol	94	1.00	
	14	1197-06-4	1209	1205	16.483	Carveol-cis	75	0.08	
	15	106-25-2	1227	1228	17.251	Nerol	81	0.44	
	16	106-26-3	1240	1240	17.85	Neral	97	25.86	
	17	106-24-1	1252	1255	18.375	Geraniol	92	1.74	
	18	141-27-5	1273	1270	19.292	Geranial	98	32.03	
	19	3856-25-5	1374	1376	23.627	α -copaene	80	0.07	
	20	515-13-9	1387	1391	24.196	β -elemene	93	0.44	
	21	87-44-5	1418	1418	25.458	Caryophyllene <(E)>	94	2.03	
	22	6753-98-6	1453	1454	26.928	α -Humulene	90	0.20	
	23	473-13-2	1494	1494	28.591	α -selinene	78	0.07	
	24	39029-41-9	1518	1513	29.516	γ -cadinene	71	0.04	
	25	1139-30-6	1582	1581	32.011	Caryophyllene oxide	92	0.27	
Total identified components								92.04	
<i>Foeniculum vulgare var. dulce</i>	1	2867-05-2	925	931	5.94	α -thujene	72	0.17	
	2	80-56-8	933	939	6.18	α -pinene	97	8.91	
	3	79-92-5	949	953	6.65	Camphene	88	0.37	
	4	3387-41-5	972	976	7.29	Sabinene	75	0.10	
	5	127-91-3	978	980	7.47	β -pinene	95	1.36	
	6	123-35-3	987	991	7.74	Myrcene	91	1.41	
	7	99-83-2	1007	1005	8.36	α -phellandrene	96	3.76	
	8	527-84-4	1024	1022	9.00	O-cymene	90	1.72	
	9	138-86-3	1029	1031	9.18	Limonene	96	11.87	
	10	99-85-4	1057	1062	10.24	γ -terpinene	82	0.29	
	12	1195-79-5	1089	1087	11.46	Fenchone	98	11.92	
	14	76-22-2	1147	1143	13.85	Camphor	94	0.71	
	15	562-74-3	1182	1177	15.31	Terpinen-4-ol	79	0.11	
	16	140-67-0	1199	1195	16.03	Estragole	95	6.32	
	17	56282-46-3	1230	1234	17.41	Fenchyl acetate	69	0.04	
	18	1118-39-4	1249	1242	18.21	Myrcenyl acetate	76	0.14	
	20	123-11-5	1261	1251	18.73	p-anisaldehyde	92	0.16	
	22	4180-23-8	1293	1283	20.14	Trans-Anethole	94	48.81	
	Total identified components								98.17
	<i>Pelargonium graveolens</i>	1	80-56-8	932	939	6.158	α -pinene	95	0.55
		2	11063-77-7	1069	1074	10.709	Linalool oxide <cis>	94	0.36
		3	34995-77-2	1086	1088	11.333	Linalool oxide <trans>	89	0.21
4		78-70-6	1100	1098	11.867	Linalool	98	4.90	
5		3033-23-6	1109	1111	12.25	Rose oxide <cis>	97	1.34	
6		5258-11-7	1125	1127	12.925	Rose oxide <trans>	96	0.57	
7		89-80-5	1155	1154	14.192	Menthone	97	2.83	
8		491-07-6	1165	1164	14.592	Isomenthone	97	6.32	
9		491-02-1	1189	1188	15.625	Menthol <neo-iso>	93	0.22	
10		98-55-5	1196	1189	15.917	α -Terpineol	95	0.50	
11		106-22-9	1231	1228	17.458	Citronellol	98	24.94	
12		106-26-3	1239	1240	17.809	Neral	93	0.46	
13		106-24-1	1254	1255	18.458	Geraniol	98	13.56	
14		105-85-1	1273	1275	19.258	Citronellyl formate	97	7.07	
15		105-86-2	1297	1300	20.308	Geranyl formate	98	3.54	
16		5208-59-3	1382	1384	23.95	β -bourbonene	97	1.45	
17		87-44-5	1417	1418	25.45	Caryophyllene <(E)>	94	1.51	
18		105-90-8	1467	1475	27.467	Geranyl propanoate	93	1.03	
19		23986-74-5	1479	1480	27.967	Germaacrene D	94	1.10	
20		106-29-6	1554	1562	30.917	Geranyl butyrate	98	1.64	
21		15051-81-7	1623	1619	33.575	Eudesmol <epi-gamma>	96	3.61	
22		7785-33-3	1693	1700	36.234	Geranyl tiglate	96	1.81	
Total identified components								79.52	
<i>Eucalyptus citriodora</i>	1	80-56-8	932	939	6.167	α -pinene	91	0.37	
	2	3387-41-5	971	976	7.283	Sabinene	90	0.06	
	3	127-91-3	978	980	7.467	β -pinene	95	0.96	
	4	99-87-6	1024	1026	9.009	p-cimene	87	0.06	
	5	138-86-3	1028	1031	9.167	Limonene	94	0.21	
	6	470-82-6	1031	1033	9.275	1,8 Cineole (Eucalyptol)	96	1.47	
	7	106-72-9	1051	1055	9.999	Bergamal	94	0.63	
	8	78-70-6	1100	1098	11.858	Linalool	91	0.4	
	9	16409-43-1	1109	1111	12.258	Rose oxide	89	0.22	
	10	106-23-0	1154	1153	14.158	Citronellal	96	54.74	
	11	59905-54-3	1160	1156	14.408	Isosopulegol	98	6.38	
	12	21290-09-5	1170	1168	14.825	neo-iso Isopulegol	93	0.75	
	13	106-22-9	1228	1228	17.292	Citronellol	98	9.3	
	14	42822-86-6	1341	1343	22.232	(+)-p-menthane-3,8-diol	95	3.16	
	15	150-84-5	1347	1354	22.476	Citronellyl acetate	94	3.21	
	16	42822-86-6	1366	1365	23.267	(-)-p-menthane-3,8-diol	93	1.24	
	17	87-44-5	1417	1418	25.441	trans- β -Caryophyllene	93	1.12	
	18	1139-30-6	1582	1581	31.984	Caryophyllene oxide	90	0.19	
Total identified components								84.47	

Fonte: da autora (2017)

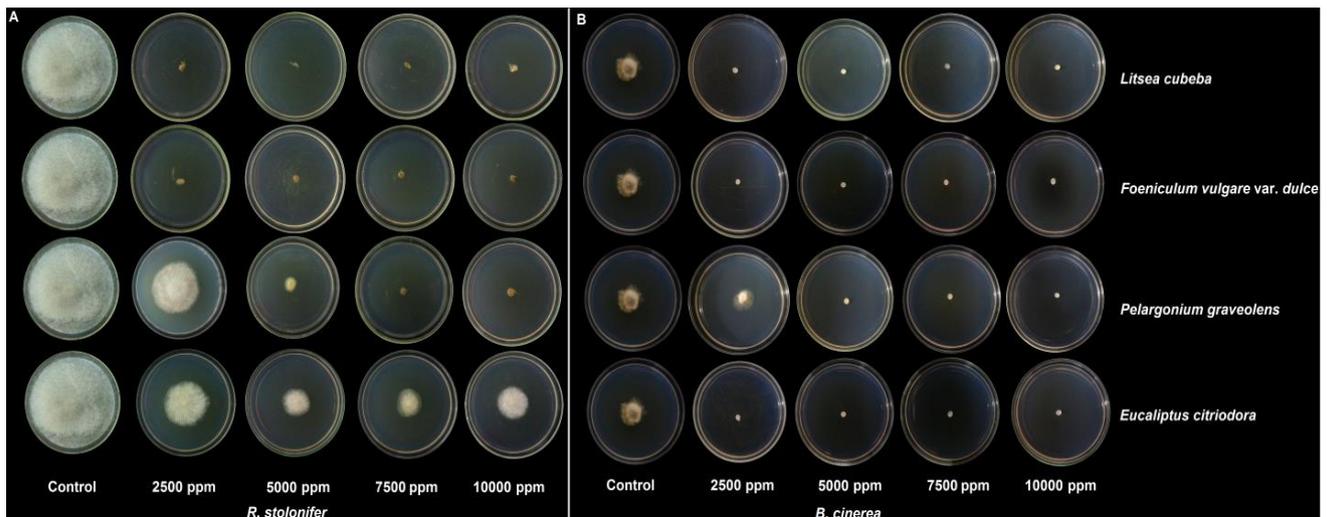
3.3 Crescimento micelial sob o efeito dos componentes voláteis dos óleos essenciais selecionados

Na figura 2, vemos o efeito das várias concentrações dos quatro melhores óleos essenciais sobre o crescimento micelial de *R. stolonifer* (2A) e *B. cinerea* (2B).

Os resultados indicaram diferenças significativas na inibição do crescimento micelial de *R. stolonifer* em virtude do aumento das concentrações de óleos utilizados (Figura 3A). Observa-se que o óleo essencial de *F. vulgare* var. *dulce* inibiu totalmente o crescimento micelial em qualquer concentração usada. Já nos óleos essenciais de *P. graveolens* e *L. cubeba*, há a total supressão do crescimento micelial do fungo a partir da concentração de 0,75%. O óleo de *E. citriodora* teve menor eficiência que os demais óleos.

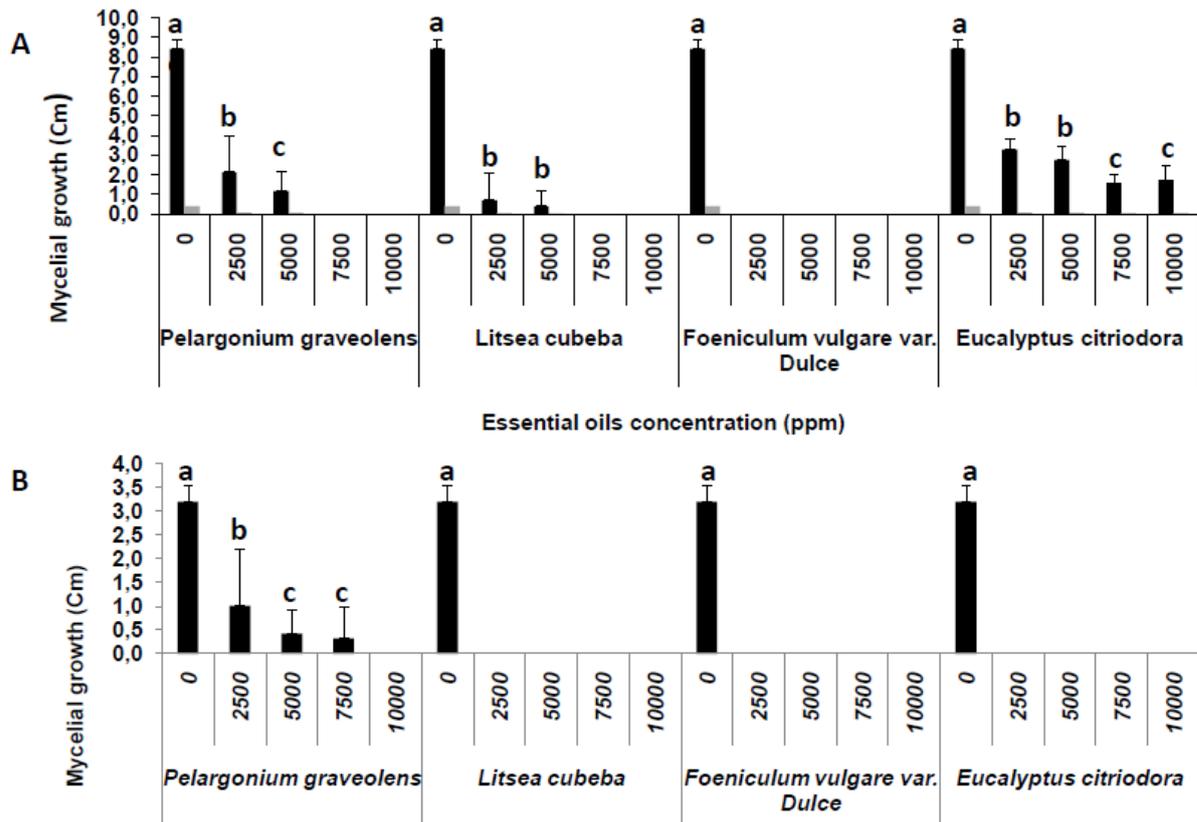
Em relação à inibição do crescimento micelial de *B. cinerea* *in vitro*, observa-se que os óleos essenciais de *L. cubeba*, *F. vulgare dulce* e *E. citriodora* controlou 100% do crescimento micelial em todas as concentrações (Figura 3B). O óleo essencial de *P. graveolens*, na concentração de 0,25%, teve sua menor eficiência, com 68,7% de inibição, e a 1,0% teve controle total do crescimento micelial.

Figura 2 - Crescimento micelial sob efeito dos componentes voláteis dos óleos essenciais selecionados para o controle de *R. stolonifer* (A) e *B. cinerea* (B).



Fonte: da autora (2017)

Figura 3 - Crescimento micelial sob efeito dos componentes voláteis dos óleos essenciais selecionados para o controle de *R. stolonifer* (A) e *B. cinerea* (B).



Fonte: da autora (2017)

Outros trabalhos relatam o efeito antimicrobiano de óleos essenciais no desenvolvimento *in vitro* de alguns patógenos. Segundo Singh et al. (2006), utilizando óleo essencial de *F. vulgare* obteve-se 100% de controle contra *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Fusarium graminearum* e *F. moniliforme* na dose de 6 μ L. Verificou-se também ser altamente eficaz mesmo a 4 μ L para *A. niger*.

Segundo Yang et al. (2010), o óleo essencial de *L. cubeba* na concentração de 300 μ g/mL mostrou uma excelente atividade fungicida contra *Sclerotinia sclerotiorum*, *Thanatephorus cucumeris* e *Alternaria mali* com taxa inibitória de 100%, 100% e 83,2%, respectivamente.

De acordo com Ramezani et al. (2002), o óleo de *E. citriodora* controlou totalmente, na concentração de 1,0 ppm, os fungos *Rhizoctonia solani* e *Alternaria solani*; na

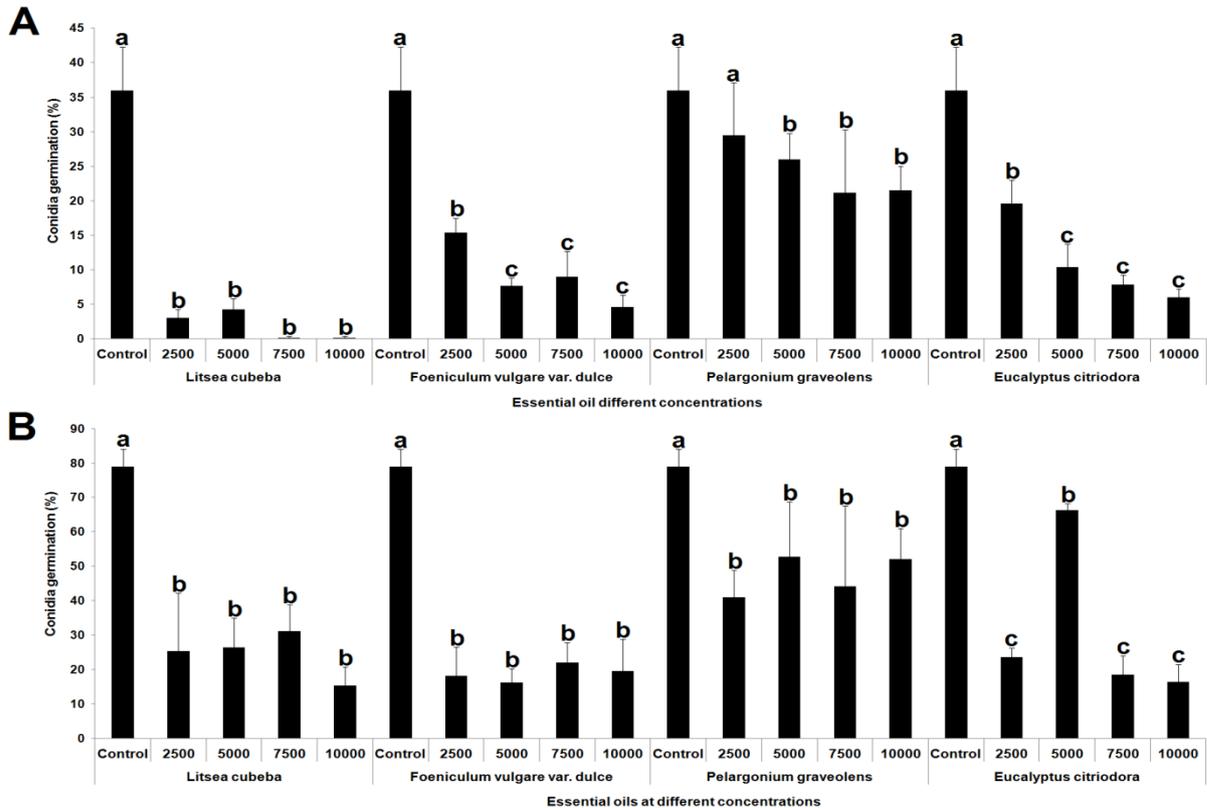
concentração de 1,25 ppm a *Macrophomina phaseolina* e *Colletotrichum lindemuthianu*; e na concentração de 1,5 ppm *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Helminthosporium oryzae* e *Alternaria triticina*.

3.4 Germinação conidial sob o efeito dos componentes voláteis dos óleos essenciais selecionados

Todos os óleos essenciais utilizados reduziram a germinação de conídios de *R. stolonifer* e *B. cinerea* quando comparados à testemunha (Figura 4). Em relação à inibição *in vitro* da germinação de conídios de *R. stolonifer* (Figura 4A), observou-se que o óleo essencial de *L. cubeba* inibiu acima de 95% a germinação dos conídios em todas as concentrações utilizadas, sem diferirem estatisticamente entre si. O óleo de *F. vulgare* var. *dulce* inibiu aproximadamente 95% a partir da concentração de 0,5%, e o óleo *E. citriodora* foi mais efetivo também a partir da concentração de 0,5%, com 90% da inibição germinação de conídios. O óleo essencial de *P. graveolens* mostrou-se menos eficaz que os demais.

Já para inibição da germinação de conídios de *B. cinerea* (Figura 4B), o óleo de *F. vulgare* var. *Dulce*, em todas as concentrações usadas, teve um controle de aproximadamente 80% da germinação dos conídios, seguido do óleo de *L. cubeba*, com uma eficiência de controle de aproximadamente 68%. O óleo essencial de *P. graveolens* mostrou menor efetividade no controle, com aproximadamente 50%.

Figura 4 - Germinação conidial sob o efeito dos componentes voláteis dos óleos essenciais selecionados contra *Rhizopus stolonifer* (A) e *Botrytis cinerea* (B).



Fonte: da autora (2017)

A literatura refere poucos estudos desses óleos essenciais usados sobre a inibição conidial de fitopatógenos. Tais resultados vêm corroborar com trabalhos de outros autores que utilizaram óleos essenciais em diversos patossistemas.

Estudos conduzidos por Tzortzakis et al. (2007) observaram que na presença do óleo essencial de citronela (*Cymbopogon citratus* L.) a esporulação dos fungos *Colletotrichum coccodes*, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium herbarum*, *Rhizopus stolonifer* e *Aspergillus niger* foi inibida até 63% a 25 ppm e completamente inibida a 500 ppm.

De acordo com Lorenzetti et al. (2011), conídios de *B. cinerea* sobre ação de óleos essenciais de capim limão (*Cymbopogon citratus*), palmarosa (*Cymbopogon martini*), menta (*Mentha pipertita*), eucalipto (*Corymbia citriodora*), canela (*Cinnamomum zeilanicum*) e cravo (*Syzygium aromaticum*) inibiram completamente a esporulação fúngica na concentração de 1000 ppm.

Segundo Abreu et al. (2016), em experimentos *in vitro* com o fungo *Alternaria solani* observou-se que o crescimento micelial e germinação de conídios foram completamente

inibidos por *Cinnamomum zeylanicum*, *Cymbopogon martini*, *C. citratus* e *Syzygium aromaticum* a partir da concentração de 750 mL/L, *Eucalyptus citriodora* e *Melaleuca alternifolia* a partir de 2000 mL/L e *Mentha piperita* a partir de 5000 mL/L.

De acordo com Fiori et al. (2000), os óleos essenciais de *Cymbopogon citratus*, *Ageratum conyzoides* e *Eucalyptus citriodora* proporcionaram 100% de inibição do crescimento micelial e germinação de esporos de *Didymella bryoniae*.

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

3.5 Efeito protetor dos componentes voláteis dos melhores óleos essenciais sobre morangos

Os dois óleos essenciais que tiveram maior eficiência nos experimentos *in vitro* foram os óleos de *F. vulgare* var. *dulce* e *L. cubeba*.

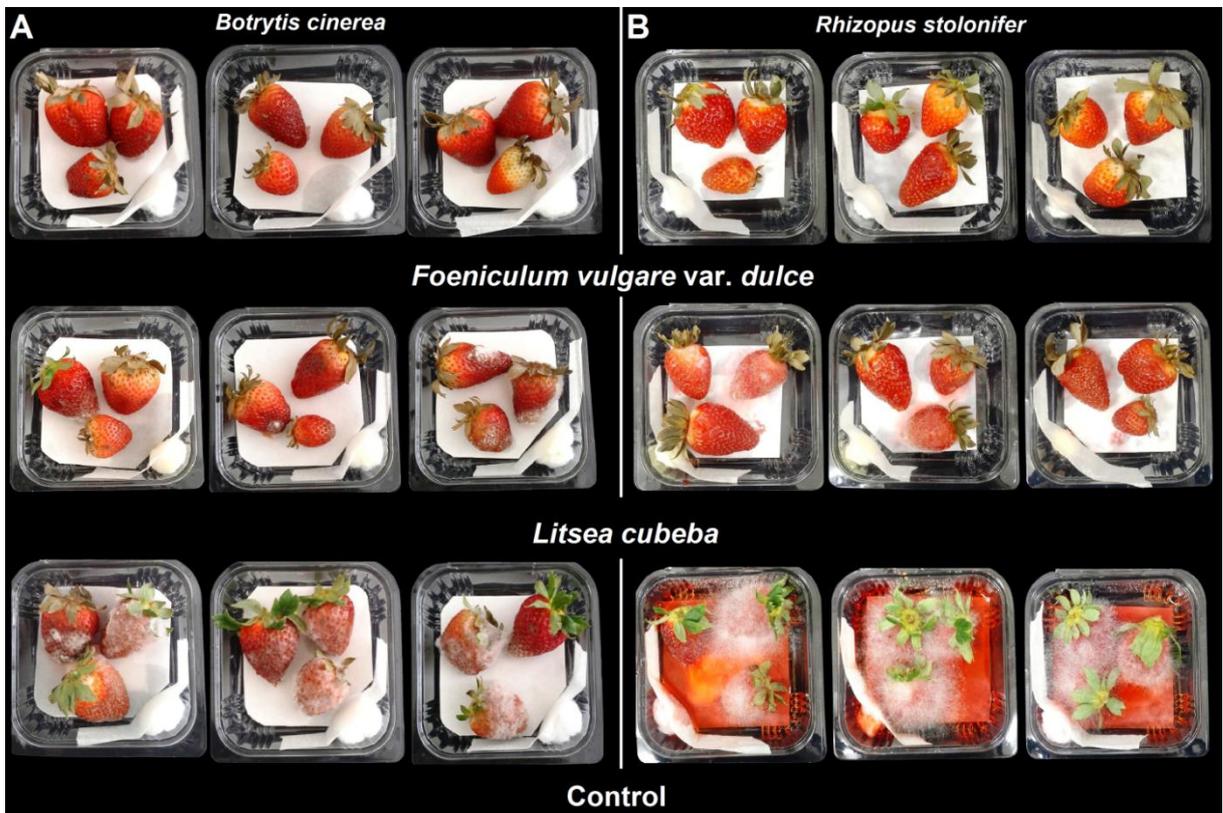
A ação dos compostos voláteis presente nos óleos essenciais testados para o controle de *B. cinerea* e *R. stolonifer* sobre frutos de morangos foi distinta para cada óleo essencial (Figura 5).

O óleo essencial de *F. vulgare* var. *dulce* na concentração usada controlou 100% do crescimento fúngico de *B. cinerea* inoculados em pseudofrutos de morangos. Os morangos apresentaram formação de estruturas fúngicas após 14 dias de armazenamento, portanto sua vida de prateleira foi de 14 dias. O óleo de *L. cubeba* não proporcionou um bom controle na dose testada (Figura 5A).

Em relação ao controle de *R. stolonifer*, o óleo *F. vulgare* var. *dulce* também controlou 100% do crescimento fúngico, e a vida de prateleira do fruto foi de três dias, enquanto o óleo de *L. cubeba* não teve eficiência no controle, apresentando formação de estruturas fúngicas (Figura 5B).

Os morangos inoculados e não submetidos à aplicação dos óleos essenciais (controle) apresentaram formação de estruturas fúngicas, confirmando a eficácia do método de inoculação utilizado.

Figura 5 - Efeito dos componentes voláteis dos óleos essenciais *F. vulgare* var. *dulce* e *L. cubeba* a 10% em morangos sobre *B. cinerea* (A) e *R. stolonifer* (B).



Fonte: da autora (2017)

Os resultados obtidos nesse experimento demonstram o potencial do uso de óleos essenciais no controle de podridões em pós-colheita de morangos. Tais resultados vêm corroborar com trabalhos de outros autores, utilizando extratos e óleos vegetais em diversos patossistemas.

Flores (2013), avaliando vários extratos vegetais em suas diferentes formas de extração - aquosa, alcoólica, maceração e infusão -, com intuito de controlar a podridão parda, causada por *Monilinia fruticola*, em pós-colheita de pêsego, evidenciou que todos os tratamentos que foram submetidos ao extrato de canola apresentaram lesões significativamente menores quando comparados a suas respectivas testemunhas. O extrato de canola obtido por infusão se destacou em relação aos demais, apresentando melhor controle de podridões nos frutos.

Bhaskara Reddy et al. (1998) mostraram o efeito do óleo essencial de dois tipos clonais de *Thymus vulgaris* (Laval-1 e Laval-2) contra *Botrytis cinerea* e *Rhizopus stolonifer* em frutos de morango. A decomposição dos frutos foi controlada até 73,6 e 73,0%,

respectivamente, por voláteis na concentração de 200 ppm de Laval-1, e até 75,8 e 74,8% de Laval-2.

Medice et al. (2007) avaliaram o potencial dos óleos de *Corymbia citriodora*, *Cymbopogon nardus*, *Azadirachta indica* e *Thymus vulgaris* nas concentrações 1%, 0,5%, 1% e 0,3%, na redução da severidade dos sintomas de *Phakospora pachyrhizi* em casa-de-vegetação. Todos os óleos retardaram a evolução da doença quando comparados com a testemunha, observando uma redução na severidade em média de 34 a 62,3%.

Outro fator que deve ser salientado neste estudo é que as condições laboratoriais durante a condução dos experimentos foram ideais para o desenvolvimento das doenças, com temperatura e umidade adequadas, além da alta concentração de inóculo dos fungos utilizada para a inoculação dos morangos. Mesmo assim, o óleo essencial de *F. vulgare* var. *dulce* controlou eficientemente o mofo cinzento e a podridão mole em pós-colheita de morangos. Com isso, espera-se que esse óleo, quando aplicado em condições reais, apresente um maior controle das doenças, uma vez que as condições reais nem sempre são vantajosas ao desenvolvimento do patógeno e a quantidade de inóculo pode ser menor.

Conclui-se, portanto, que os voláteis do óleo essencial de *F. vulgare* var. *dulce* podem ser utilizados como fumigantes para o manejo de doenças de plantas, tais como o controle de doenças pós-colheita na conservação de frutos e vegetais.

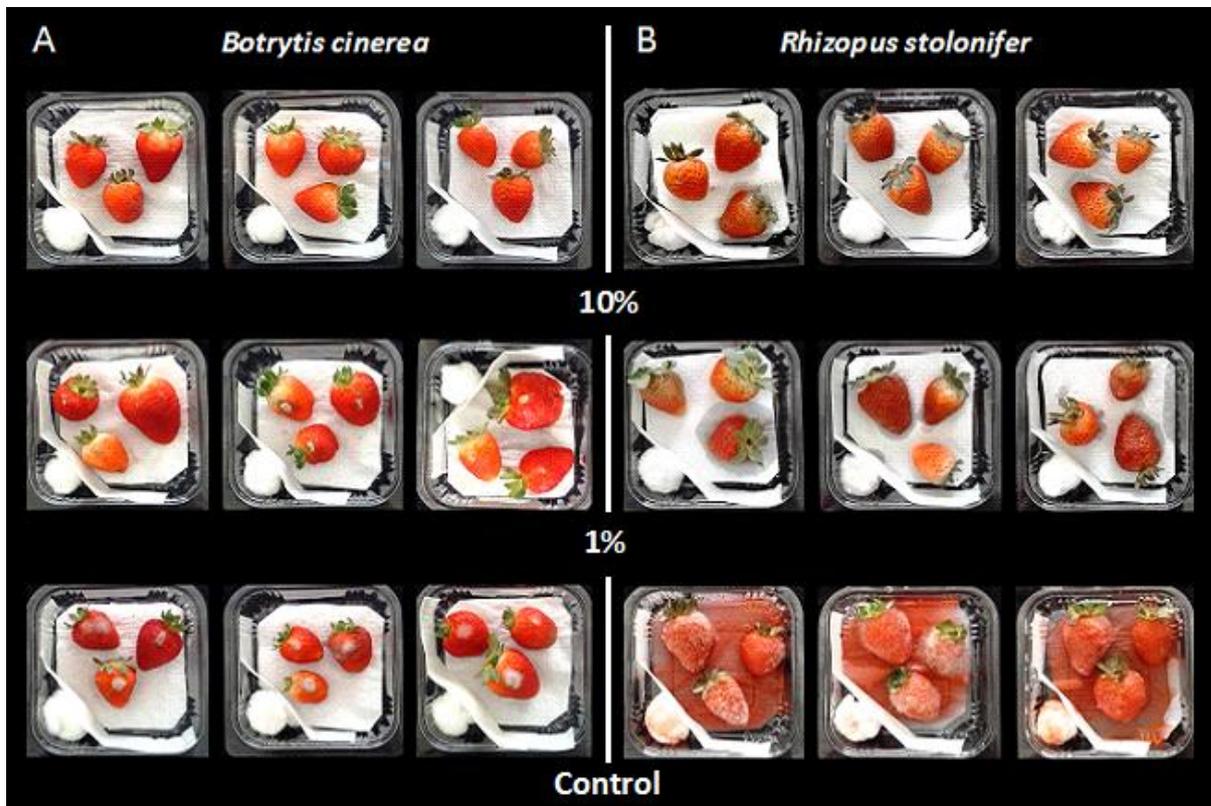
3.6 Efeito protetor do volátil do componente majoritário sobre morangos

O óleo essencial que teve maior eficiência no experimento *in vivo* foi o óleo de *F. vulgare* var. *Dulce*. Com isso, foi utilizado o seu principal componente, o trans-anethole (48,81%), para a realização deste experimento.

O componente majoritário trans-anethole na concentração de 10% controlou 100% do crescimento fúngico de *B. cinerea* inoculados em pseudofrutos de morangos. Os morangos apresentaram formação de estruturas fúngicas após 10 dias de armazenamento, portanto sua vida de prateleira em 10 dias. O trans-anethole na concentração de 1% não proporcionou um controle efetivo, apresentando formação de estruturas fúngicas (Figura 6A).

Em relação ao controle de *R. stolonifer*, o trans-anethole na concentração de 10% também controlou 100% do crescimento fúngico e a vida de prateleira do fruto foi de 3 dias, enquanto na concentração de 1% não teve eficiência no controle apresentando mudança de textura dos frutos, ficando mais aquosos (Figura 6B).

Figura 6 - Efeito do volátil do componente majoritário trans-anethole a 1% e 10% em morangos sobre *B. cinerea* (A) e *R. stolonifer* (B).



Fonte: da autora (2017)

Até onde sabemos, não houve estudos detalhados sobre o uso de óleo essencial de *F. vulgare* var. *dulce* e seu principal componente trans-anetol contra fungos fitopatogênicos.

A maior parte da atividade antifúngica em óleos derivados de *F. vulgare* parece derivar de compostos fenólicos enquanto outros constituintes contribuem pouco. Já foram relatados estudos que compostos purificados de óleos voláteis anetole possuem atividade antimicrobiana (Curtis, et al. 1996; De et al. 2002,).

Chang et al. (2009) relataram que trans-anethole possui ação inseticida contra três espécies de moscas das frutas .

Huang et al. (2010) avaliaram a atividade antifúngica dos componentes voláteis do óleo essencial *Illicium verum*, bem como seu componente majoritário trans-anetol contra dois patógenos de pós-colheita, *Pythium aphanidermatum* e *Botryodiplodia. theobromae*, e obtiveram a maior inibição do crescimento micelial na concentração de 0,5 mg/mL.

Tanto o óleo essencial como o trans-anetol exibiram um forte efeito inibitório contra os fungos do ensaio, indicando que a maioria das propriedades antifúngicas observadas era

devida à presença de trans-anetol no óleo, que poderia ser desenvolvido como fungicidas naturais para o controle de doenças em frutos e preservação vegetal.

4 CONCLUSÃO

O óleo essencial de *F.vulgare var. dulce* em todas as concentrações usadas inibe totalmente o crescimento micelial dos fungos *B. cinerea* e *R. stolonifer*

O óleo essencial de *L. cubeba* e *F. vulgare var. dulce* reduz a germinação de conídios dos fungos *B. cinerea* e *R. stolonifer*.

O óleo essencial de *F. vulgare var. dulce* e seu componente majoritário trans-anethole apresentou 100% de controle nos frutos de morango.

Portanto, os voláteis do óleo essencial de *Foeniculum vulgare var. dulce* e de seu componente majoritário, trans-anethole, mostra-se uma opção promissora para o desenvolvimento de possíveis produtos fitossanitários, podendo ser utilizado como fumigante para o manejo de doenças em pós-colheita e na conservação de frutos de morangos.

REFERÊNCIAS

- ABREU, C. L. M.; FERES, C. I. M. A.; FURTADO, E. L.; MING, L. C.; MARQUES, M. O. M.; ACÁCIO, R. S.; RIFFEL, A.; GOULART, H. F.; SANTANA, A. E. G.; BERNARDES, F. S.; CÂMARA, F. L. A. Efficient control of conidium germination, mycelia growth and early blight in tomato in vitro with essential oils under farm conditions. **African Journal of Agricultural Research**, Vol. 11(43), p. 4401-4412, 27 October, 2016.
- ABREU, C. L. M. **Controle de Alternaria solani em tomateiro (Lycopersicon esculentum) com óleos essenciais**. Botucatu, 2006. 71f. Tese (Doutorado em Agronomia/Horticultura) – Faculdade de Ciências Agrônômicas. Universidade Estadual Paulista, 2006.
- BAUTISTA-BANOS, S.; GARCIA, E.; BARREIRA, L.; REYES, N.; WILSON, C. Seasonal evaluation of the postharvest fungicidal activity of powders and extracts of huamuchil (*Pothecello biumdulce*): action against *Botrytis cinerea*, *Penicillium digitatum* and *Rhizopus stolonifer* of strawberry fruit. **Postharvest Biology and Technology**. Washington. V 29. N. 1, p. 81-92. 2003.
- BATISHA, D. R.; SINGH, H. P.; SETIA, N.; KAURA, S.; KOHLIA, R. K. Essential Oil from Decaying Leaves of *Eucalyptus citriodora*. **Z. Naturforsch.** p. 52-56. 2006.
- BHASKARA REDDY, M. V. ; ANGERS, P.; GOSSELIN, A.; ARUL, J. Characterization and use of essential oil from *Thymus vulgaris* against *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer* in strawberry fruits. **Phytochemistry**. V.47, p. 1515-1520. April, 1998.
- BISHOP, C.D. & REAGAN, J. Control of the storage pathogen *Botrytis cinerea* on dutch white cabbage (*Brassica oleraceae* var. *Capitata*) by the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. **Journal of Essential Oil Research** 10: 57-60. 1998.
- BOUZENNA, H. & KRICHEN, L. *Pelargonium graveolens* L'Her. and *Artemisia arborescens* L. essential oils: Chemical composition, antifungal activity against *Rhizoctonia solani* and insecticidal activity against *Rhysopertha dominica*. **Natural Product Research**. V. 27. 2013.
- CANTILLANO, R.F.F.; SILVA, M.M. Manuseio pós-colheita de morangos. **Embrapa Clima Temperado**. Documentos, 318. Pelotas: Embrapa Clima Temperado; p.36. 2010.
- CHANG, C. L.; CHO, I. K.; LI, Q. X. Insecticidal Activity of Basil Oil, trans-Anethole, Estragole, and Linalool to Adult Fruit Flies of *Ceratitis capitata*, *Bactrocera dorsalis*, and *Bactrocera cucurbitae*. **Journal of Economic Entomology**, 102. p. 203-209. 2009.
- CURTIS, O. F.; SHETTY, K.; CASSAGNOL, G.; PELEG, M. Comparison of synthetic and lethal effects of synthetic versions of plant metabolites (anethole, eugenol, carvacrol, thymol) on food spoilage yeast (*Debaromyces haneneni*). **Food Biotechnology**, 10. p. 55-73. 1996.
- DE, M.; DE, A. K.; SEN, P.; BANERJEE, A. B. Antimicrobial properties of star anise (*Illicium verum* Hook f). **Phytotherapy Research**, 16, p. 94-95. 2002.
- FAO. Food and agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT: Agricultural Production/strawberry. 2013.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA. 45. 2000. São Carlos . **Anais**. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos/Sociedade Internacional de Biometria, p. 255-258. 2000.

FIORI, A. C. G.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; VIDA, J. B.; SCAPIM, C. A.; CRUZ, M. E. S.; PASCHOLATI, S. F.. Antifungal Activity of Leaf Extracts and Essential Oils of some Medicinal Plants against *Didymella bryoniae*. **Journal Phytopathology**, 148, p. 483-487. 2000.

FLORES, M. F. **Extratos vegetais no controle de podridão parda (*Monilinia fructicola*) em pêssago**. 2013. 60f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, Pato Branco, 2013.

GHINI, R.; KIMATI, H. Resistência de fungos a fungicidas. Jaguariúna: **Embrapa Meio Ambiente**, p. 78. 2002.

HUANG, Y.; ZHAO, J.; ZHOU, L.; WANG, J.; GONG, Y.; CHEN, X.; GUO, Z.; WANG, Q.; JIANG, W. Antifungal Activity of the Essential Oil of *Illicium verum* Fruit and Its Main Component trans-Anethole. **Molecules**, 15, p. 7558-7569. 2010.

LORENZETTI, E.R.; MONTEIRO, F.P.; SOUZA, P.E.; SOUZA, R.J.; SCALICE, H.K.; DIOGO JR, R.; PIRES, M.S.O. Bioatividade de óleos essenciais no controle de *Botrytis cinerea* isolado de morangueiro. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.13, especial, p.619-627. 2011.

M. B. EMBONG; D. HADZIYEV; S. MOLNAR. Essential Oils From Spices Grown In Alberta. Fennel Oil (*Foeniculum vulgare* var. *dulce*). **Canadian Journal of Plant Science**. 57(3): p. 829-837. 1977.

MEDICE, R.; ALVES, E.; ASSIS, R.T.; MAGNO-JUNIOR, R.G. & LOPES, H.A.G.L. Óleos essenciais no controle da ferrugem asiática da soja *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd. **Ciência e Agrotecnologia** 31: 83-90. 2007.

OLIVERO-VERBEL, J.; NERIO, L. S.; STASHENKO, E. E. Bioactivity against *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae) of *Cymbopogon citratus* and *Eucalyptus citriodora* essential oils grown in Colombia. **Pest Management Science**. 66: p. 664-668. 2010.

PARK, IK.; KIM, J.; LEE, SG.; SHIN, SC. Nematicidal Activity of Plant Essential Oils and Components From Ajowan (*Trachyspermum ammi*), Allspice (*Pimenta dioica*) and Litsea (*Litsea cubeba*) Essential Oils Against Pine Wood Nematode (*Bursaphelenchus Xylophilus*). **Journal of Nematology** 39(3): p. 275–279. 2007.

PEREIRA, R. B.; LUCAS, G. C.; PERINA, F. J.; RIBEIRO JR, P. M. R.; ALVES, E. Óleo essencial de citronela no controle e na ativação de respostas de defesa do cafeeiro contra a ferrugem e cercosporiose. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 36, n. 4, p. 383-390. 2012.

- PETERSON, A.; MACHMUDAH, S.; ROY, B. C.; GOTO, M.; SASAKI, M.; HIROSE, T. Extraction of essential oil from geranium (*Pelargonium graveolens*) with supercritical carbon dioxide. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**. [S.S], v. 81, p. 167-172, 2006.
- RAMEZANI, H.; SINGH, H.P.; BATISH, D.R.; KOHLI, R.K. Antifungal activity of the volatile oil of *Eucalyptus citriodora*. **Fitoterapia**. 73 p. 261-262. 2002.
- SHAHAT, A. A.; IBRAHIM, A. Y.; HENDAWY, S. F.; OMER, E. A.; HAMMOUDA, F. M.; ABDEL RAHMAN, F. H.; SALEH, M. A. Chemical Composition, Antimicrobial and Antioxidant Activities of Essential Oils from Organically Cultivated Fennel Cultivars. **Molecules**. 16, 1366-1377. 2011.
- SINGH, G.; MAURYA, S.; LAMPASONA, M. P.; CATALAN, C. Chemical constituents, antifungal and antioxidative potential of *Foeniculum vulgare* volatile oil and its acetone extract. **Food Control** 17 P. 745–752. 2006.
- SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In. Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2. Ed. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Universidade Federal de Santa Catarina, 2000. P. 394-412.
- STANGARLIN, J. R. Uso de extratos e óleos essenciais no controle de doenças de plantas. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32 suplemento, p. 94– 6. 2007.
- TZORTZAKIS, N. G.; ECONOMAKIS, C. D. Antifungal activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus* L.) essential oil against key postharvest pathogens. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Amsterdam, v. 8, n. 2, p. 253-258, 2007.
- YANG, Y; JIANG, J.; QIMEI, L.; YAN, X.; ZHAO, J.; YUAN, H.; QIN, Z.; WANG, M. The Fungicidal Terpenoids and Essential Oil from *Litsea cubeba* in Tibet. **Molecules**, 15, p. 7075-7082. 2010.