



LUCIANE CRISTINA ROSWALKA

ÓLEOS ESSENCIAIS: AÇÃO SOBRE
Colletotrichum gloeosporioides E *Colletotrichum*
musae, ASSOCIADOS OU NÃO À PELÍCULA DE
FÉCULA DE MANDIOCA NO CONTROLE DA
ANTRACNOSE EM GOIABA

LAVRAS - MG
2010

LUCIANE CRISTINA ROSWALKA

**ÓLEOS ESSENCIAIS: AÇÃO SOBRE *Colletotrichum gloeosporioides* E
Colletotrichum musae, ASSOCIADOS OU NÃO À PELÍCULA DE FÉCULA
DE MANDIOCA NO CONTROLE DA ANTRACNOSE EM GOIABA**

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

Orientador
Dr. Eduardo Alves

**LAVRAS - MG
2010**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Roswalka, Luciane Cristina.

Óleos essenciais : ação sobre *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum musae*, associados ou não a película de fécula de mandioca no controle da antracnose em goiaba / Luciane Cristina Roswalka. – Lavras : UFLA, 2010.

198 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2010.

Orientador: Eduardo Alves.

Bibliografia.

1. Frutos. 2. Doença pós-colheita. 3. Controle alternativo de doenças. 4. Microscopia eletrônica. 5. Doenças fúngicas. 6. Fungos fitopatogênicos. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 632.4

LUCIANE CRISTINA ROSWALKA

**ÓLEOS ESSENCIAIS: AÇÃO SOBRE *Colletotrichum gloeosporioides* E
Colletotrichum musae, ASSOCIADOS OU NÃO À PELÍCULA DE FÉCULA
DE MANDIOCA NO CONTROLE DA ANTRACNOSE EM GOIABA**

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

APROVADA em 16 de abril de 2010.

Dr. Hilário Antônio de Castro	UFLA
Dr. Mário Sobral de Abreu	UFLA
Dra. Joelma Pereira	UFLA
Dra. Maria das Graças Cardoso	UFLA
Dra. Louise Larissa May De Mio	UFPR

Dr. Eduardo Alves
Orientador

**LAVRAS - MG
2010**

*Aos meus pais, Vani e Reinaldo.
Aos meus irmãos, Marcelo e Rodrigo.
Aos meus sobrinhos, Pedro e Matheus.
À minha cunhada Edna,
pelo apoio, compreensão e paciência,*

DEDICO

*A Deus,
fonte de sabedoria e bondades infinitas,
que, sempre presente em minha vida, abençoando todos os meus dias,
permitiu a realização deste ideal,*

AGRADEÇO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade e estrutura para a realização do doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa e pelo apoio financeiro ao projeto de pesquisa MCT/CNPq 15/2007 - Universal - 476317/07-0.

Ao Professor Eduardo Alves, pela orientação, apoio e paciência.

Aos professores da pós-graduação, pelo compartilhamento do saber.

Aos servidores técnico-administrativos do Departamento de Fitopatologia, pelos serviços prestados, amizade e incentivo.

Aos bolsistas de iniciação científica.

A todos os amigos da pós-graduação.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

O presente trabalho foi realizado com o objetivo geral de avaliar o potencial de óleos essenciais no controle de *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum musae* e associados ou não à película de fécula de mandioca no controle da antracnose em goiaba (*Psidium guajava* L.). Na fase de vapor, os compostos voláteis dos óleos essenciais de *Cinnamomum* sp., *Cordia verbenacea*, *Eugenia caryophyllata*, *Ocimum selloi*, *Origanum vulgare*, *Pimpinella anisum* e *Thymus vulgaris* demonstraram ação fungitóxica, inibindo totalmente o crescimento micelial de *C. gloeosporioides* e *C. musae*, este também inibido por *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon martinii*, *Laurus nobilis*, *Lavandula officinalis*, *Mentha arvensis* e *Ocimum basilicum*, *in vitro*. Na fase de contato, os compostos fixos e voláteis de *O. basilicum*, *P. anisum*, *M. arvensis*, *Matricaria recutita*, *C. verbenacea*, *L. nobilis*, *O. vulgare*, *C. martinii*, *E. caryophyllata*, *T. vulgaris*, *C. citratus* e *Cinnamomum* sp. inibiram totalmente a germinação de conídios dos patógenos. A germinação de *C. musae* foi também inibida por *O. selloi*, *Melaleuca alternifolia*, *Citrus sinensis*, *L. officinalis* e *Zingiber officinale*, *P. anisum*, *M. arvensis* e *C. citratus*. Observou-se apenas inibição total na formação de apressórios de *C. musae* pelo óleo essencial de *Chamaecyparis plumosa*. Por meio de cromatografia gasosa e espectrometria de massa, foram identificados 70 compostos em 25 óleos essenciais. As frações antifúngicas ativas sobre os patógenos foram determinadas em cromatografia de camada delgada (bioautografia). A película à base de fécula de mandioca a 2,0%, associada ou não aos óleos essenciais de *Cinnamomum* sp., *E. caryophyllata*, *C. martinii*, *C. citratus* e *T. vulgaris*, se apresentou como uma barreira ao desenvolvimento do patógeno latente ou inoculado, não permitindo o desenvolvimento de lesões típicas de antracnose nas goiabas, proporcionando o aumento da vida útil de prateleira. Por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV), observou-se que os apressórios (estruturas de pré-penetração) foram fundamentais para o estabelecimento da infecção; que a película à base de fécula de mandioca a 2,0% estimulou a formação de apressórios por *C. gloeosporioides*, entretanto, limitou a colonização dos tecidos dos frutos de goiabeira e a reprodução do patógeno e que o óleo essencial de *T. vulgaris* na fase de vapor promoveu o intenso colapso das hifas do patógeno. Por meio de microscopia eletrônica de transmissão (MET), constatou-se que os óleos essenciais de *Cinnamomum* sp., *C. citratus*, *E. caryophyllata*, *C. martinii* e *T. vulgaris* apresentaram ação fungitóxica direta sobre *C. gloeosporioides*, causando severos danos à ultraestrutura celular dos conídios.

Palavras-chave: Doença pós-colheita de frutos. Controle alternativo de doenças. Microscopia eletrônica.

ABSTRACT

The present study had as a general objective to evaluate the potential of essential oils in the control of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum musae*, associated or not to the starch pellicle, on the control of the anthracnose in guava (*Psidium guajava* L.). In the steam phase, the volatile compounds of the essential oils of *Cinnamomum* sp., *Cordia verbenacea*, *Eugenia caryophyllata*, *Ocimum selloi*, *Origanum vulgare*, *Pimpinella anisum* and *Thymus vulgaris* demonstrated fungitoxic action totally inhibiting the micelial growth of *C. gloeosporioides* and *C. musae*, this also was inhibited by *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon martinii*, *Laurus nobilis*, *Lavandula officinalis*, *Mentha arvensis*, *Ocimum basilicum*, *in vitro*. In the contact phase, the fixed and volatile compounds of *O. basilicum*, *P. anisum*, *M. arvensis*, *Matricaria recutita*, *C. verbenacea*, *L. nobilis*, *O. vulgare*, *C. martinii*, *E. caryophyllata*, *T. vulgaris* and *C. citratus* and *Cinnamomum* sp. totally inhibited the pathogen conidia germination. The germination of *C. musae* was also inhibited by *O. selloi*, *Melaleuca alternifolia*, *Citrus sinensis*, *L. officinalis* and *Zingiber officinale*, *P. anisum*, *M. arvensis* and *C. citratus*. Total inhibition of the formation of *C. musae* appressoria was only observed by the essential oil of *Chamaecyparis plumosa*. Through gas chromatography and mass spectrometry 70 compounds in 25 essential oils were identified. The antifungal fractions active on the pathogens were determined in thin layer chromatography (bioautography technique). The cassava starch based pellicle at 2.0%, associated or not to the essential oils of *Cinnamomum* sp., *E. caryophyllata*, *C. martinii*, *C. citratus* and *T. vulgaris* presented as a barrier to the development of the latent or inoculated pathogen, not allowing the development of lesions typical of anthracnose in the guavas, providing an increase of the shelf life. Through scanning electron microscopy (SEM); it was observed that the appressoria (pre-penetration structures) were fundamental for the establishment of the infection; the starch based pellicle at 2.0% stimulated the appressoria formation for *C. gloeosporioides*, however, it limited the colonization of the of the guava fruits tissues and the reproduction of the pathogen; and, that the essential oil of *T. vulgaris* in the steam phase promoted the intense collapsing of the pathogen hyphae. Through transmission electronic microscopy (TEM), it was verified that the essential oils of *Cinnamomum* sp., *C. citratus*, *E. caryophyllata*, *C. martinii* and *T. vulgaris* presented direct fungitoxic action on *C. gloeosporioides* causing severe damage to the cellular ultrastructure of the conidia.

Keywords: Postharvest diseases in fruits. Alternative control of plant diseases. Electron microscopy.

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1 Introdução geral	13
1	INTRODUÇÃO	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1	Fruticultura no Brasil	18
2.2	Origem, classificação botânica, importância alimentar, social e econômica da goiabeira (<i>Psidium guajava</i> L.)	21
2.2	Antracnose em frutos de goiabeira (<i>Psidium guajava</i> L.)	25
2.3	Manejo de doenças em pós-colheita	27
2.4	Óleos essenciais no controle de fitopatógenos	32
2.5	Películas biodegradáveis	49
2.6	A microscopia eletrônica na elucidação da interação patógeno-hospedeiro (histopatologia) e do modo de ação de produtos em patógenos	53
	REFERÊNCIAS	58
	CAPÍTULO 2 Composição química e atividade antifúngica de óleos essenciais sobre <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> e <i>Colletotrichum musae</i>	71
1	INTRODUÇÃO	74
2	MATERIAL E MÉTODOS	77
2.1	Local	77
2.2	Obtenção dos isolados de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> e <i>Colletotrichum musae</i> e verificação de patogenicidade	77
2.3	Obtenção dos óleos essenciais	78
2.4	Atividade de compostos voláteis e fixos de óleos essenciais sobre crescimento micelial de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> e <i>Colletotrichum musae</i>, <i>in vitro</i>	79
2.5	Atividade de óleos essenciais sobre a germinação e formação de apressórios de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> e <i>Colletotrichum musae</i>, <i>in vitro</i>	80
2.6	Identificação da composição química de óleos essenciais - Perfil cromatográfico de óleos essenciais	81
2.7	Determinação da fração antifúngica dos óleos essenciais sobre <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> e <i>Colletotrichum musae</i> por meio de cromatografia em camada delgada - bioautografia	83
2.7.1	Determinação da fase móvel (solvente de eluição)	83

2.7.2	Determinação da fração antifúngica dos óleos essenciais sobre <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> e <i>Colletotrichum musae</i> por meio de cromatografia em camada delgada - bioautografia.....	84
2.7.3	Identificação dos compostos das frações antifúngicas dos óleos essenciais sobre <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> e <i>Colletotrichum musae</i> em fase fixa ou estacionária por meio de cromatografia gasosa.....	85
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	86
3.1	Atividade antifúngica de compostos voláteis e fixos de óleos essenciais sobre crescimento micelial de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> e <i>Colletotrichum musae</i> , <i>in vitro</i>	86
3.2	Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre a germinação e a formação de apressórios de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> e <i>Colletotrichum musae</i> , <i>in vitro</i>	89
3.3	Identificação da composição química de óleos essenciais - Perfil cromatográfico de óleos essenciais	99
3.4	Determinação da fração antifúngica dos óleos essenciais sobre <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> e <i>Colletotrichum musae</i> por meio de cromatografia em camada delgada.....	118
4	CONCLUSÕES	121
	REFERÊNCIAS	122
	CAPÍTULO 3 Película à base de fécula de mandioca e óleos essenciais no controle de antracnose em frutos de goiabeiras (<i>Psidium guajava</i> L.)	127
1	INTRODUÇÃO	130
2	MATERIAL E MÉTODOS	134
2.1	Local de realização dos experimentos.....	134
2.2	Obtenção e seleção dos óleos essenciais	134
2.3.	Obtenção e preparo dos frutos de goiabeira (<i>Psidium guajava</i> , L.).....	134
2.4	Obtenção da fécula de mandioca.....	135
2.5	Películas biodegradáveis à base de fécula de mandioca e óleos essenciais no controle de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> em frutos de goiabeira	135
2.5.1	Preparo dos géis para recobrimento dos frutos de goiabeira	135
2.5.2	Cobertura dos frutos de goiabeira	135
2.5.3	Inoculação	137
2.6	Severidade da antracnose em frutos de goiabeira	137
2.7	Preparo das amostras de frutos de goiabeira cobertos com película à base de fécula de mandioca (2%) para microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	138
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	139

3.1	Películas biodegradáveis à base de fécula de mandioca e óleos essenciais no controle de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> em frutos de goiabeira	139
3.1.1	Cobertura dos frutos de goiabeira	139
3.1.2	Severidade da antracnose em frutos de goiabeira	143
4	CONCLUSÕES	152
	REFERÊNCIAS	153
	CAPÍTULO 4 Estudos ultraestruturais das ações de película de fécula de mandioca e de óleos essenciais em frutos de goiabeira sobre <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> e de óleos essenciais sobre conídios do patógeno	159
1	INTRODUÇÃO	162
2	MATERIAL E MÉTODOS	165
2.1	Local	165
2.2	Efeito de compostos fixos e voláteis de óleos essenciais e película à base de fécula de mandioca sobre infecção de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> em frutos de goiabeira por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	165
2.2.1	Obtenção e preparo dos frutos de goiabeira (<i>Psidium guajava</i> , L.)	165
2.2.2	Estudo dos eventos de pré-penetração e reprodução de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> em frutos de goiabeira tratados ou não com película à base de fécula de mandioca (2%)	165
2.2.2.1	Estudo dos eventos de pré-penetração e reprodução de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> em frutos de goiabeira por meio de microscopia eletrônica de varredura	166
2.2.2.2	Efeito da película à base de fécula de mandioca (2%) sobre os eventos de pré-penetração e reprodução de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> em frutos de goiabeira, por meio de microscopia eletrônica de varredura.....	166
2.2.2.3	Efeito de óleos essenciais sobre os eventos de pré-penetração de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> em frutos de goiabeira por meio de microscopia eletrônica de varredura	167
2.2.2.4	Efeito de compostos voláteis de óleos essenciais e película à base de fécula de mandioca sobre os eventos de pré-penetração e reprodução de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> em frutos de goiabeira por meio de microscopia eletrônica de varredura	168
2.2.2.5	Preparo das amostras para microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	169
2.2.2.6	Efeito de óleos essenciais sobre ultraestrutura de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> por meio de microscopia eletrônica de transmissão (MET)	170
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	173

3.1	Eventos de pré-penetração e reprodução de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> em frutos de goiabeira observados por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV)	173
3.2	Efeito da película à base de fécula de mandioca (2%) sobre os eventos pré-penetração e reprodução de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> em frutos de goiabeira, por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	176
3.3	Óleos essenciais sobre os eventos pré-penetração de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> em frutos de goiabeira, por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV)	179
3.4	Efeito de compostos voláteis de óleos essenciais e película à base de fécula de mandioca sobre os eventos de pré-penetração e reprodução de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> em frutos de goiabeira, por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	183
3.5	Efeito de óleos essenciais sobre ultraestrutura de conídios de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , por meio de microscopia eletrônica de transmissão (MET)	185
4	CONCLUSÕES	190
	REFERÊNCIAS	191
	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	197

CAPÍTULO 1

Introdução geral

1 INTRODUÇÃO

A busca por uma vida mais longa e com qualidade incitou a preocupação e a conscientização da população mundial sobre questões relacionadas à saúde e ao meio ambiente, desencadeando mudanças no comportamento e no nível de exigência dos consumidores.

A mudança de hábitos alimentares, denotada principalmente pelo aumento no consumo de frutas e hortaliças, atrelada à exigência dos consumidores e dos países importadores protegidos por barreiras fitossanitárias por produtos com qualidade extrínseca e intrínseca, produzidos de maneira a garantir proteção à saúde e ao meio ambiente, apresenta-se como um dos fatores determinantes para a participação do Brasil no mercado internacional.

Assim, o desafio da fruticultura moderna consiste na capacidade de gerar produtos de qualidade e saudáveis, em conformidade com os requisitos de sustentabilidade ambiental, segurança alimentar e viabilidade econômica, mediante a utilização de tecnologias não-agressivas ao meio ambiente e à saúde humana (ANDRIGUETO; KOSOSKI, 2002).

O controle químico, em muitos casos considerado como a única medida eficiente para o controle de doenças, atualmente, caracteriza-se como uma tecnologia agressiva, em função da utilização exacerbada e indiscriminada de agrotóxicos que pode propiciar a contaminação do ambiente, oferecer riscos à saúde do homem e dos animais, tornando-os vulneráveis às infecções e, até mesmo, ao câncer, pela ingestão diária de resíduos acima dos limites máximos aceitáveis e de determinados princípios ativos proibidos e até banidos em países importadores. Além disso, o uso contínuo pode promover a seleção de fungos patogênicos.

Ainda que as culturas sejam submetidas ao controle químico, as perdas significativas decorrentes de podridões patológicas que ocasionam redução do

período de comercialização, desclassificação e descarte de produtos, comprometendo o aspecto econômico, evidenciam a ineficiência dos tratamentos químicos realizados em pré-colheita e a necessidade do manejo em pós-colheita.

Em frutos de goiabeiras (*Psidium guajava*, L.), ressalta-se tal fato pela alta incidência e severidade da antracnose. A antracnose, ou mancha-chocolate, é considerada uma das doenças mais graves em pós-colheita, causada pelo patógeno *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) (GORGATTI NETTO, 1996) e, juntamente com as exigências do mercado sobre resíduos de produtos químicos, apresenta-se como um entrave para a exportação.

Diante dessa realidade, a utilização de métodos alternativos de controle tornou-se imprescindível. Uma possibilidade baseia-se na exploração da atividade biológica de compostos naturais biologicamente ativos em 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.

Considerando-se a conservação da goiaba durante poucas semanas, para a eficiência do controle de patógenos em pós-colheita, estratégias devem ser estabelecidas com base no processo de maturação.

Alguns autores relatam a eficiência de películas comestíveis na conservação das características físicoquímicas de frutas e hortaliças durante o processo de maturação, entretanto, não destacam eficiência dessas na inibição do crescimento microbiano.

A inibição do crescimento microbiano pode ser obtida pelo efeito sinérgico da combinação de vários fatores ou obstáculos, em vez de ser alcançada pela aplicação drástica de um único fator de conservação, com base na tecnologia de métodos combinados (TMC), também conhecida como tecnologia de obstáculos (Hurdle Technology).

Nesse contexto, a associação de óleos essenciais a películas, não documentada ainda, apresenta-se como uma nova estratégia a ser pesquisada no controle de doenças em pós-colheita, fundamentando a seguinte hipótese: se os óleos essenciais e as películas, combinados ou não, propiciarem a inibição de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.), agente etiológico da antracnose em frutos de goiabeiras (*Psidium guajava* L.), conservando as características físico-químicas e prolongando a vida de prateleira, então, constituirão um método alternativo potencial que permitirá a comercialização de frutos livres de resíduos de agrotóxicos e agentes microbianos por um período maior, atendendo às exigências impostas pelo mercado.

Diante do exposto, o presente trabalho foi realizado com o objetivo geral de avaliar o potencial de óleos essenciais e películas biodegradáveis, em combinação ou não, para o controle de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) em frutos de goiabeiras (*Psidium guajava* L.), agente etiológico da antracnose. Para consolidação desse objetivo, os objetivos específicos foram:

- avaliação da atividade antifúngica de compostos voláteis (fase de vapor) sobre crescimento micelial e de compostos voláteis e fixos (fase de contato) de óleos essenciais sobre germinação e formação de apressórios de *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum musae*, *in vitro*;

- identificação dos componentes dos óleos essenciais por meio de cromatografia em fase gasosa e espectrometria de massas;

- determinação da fração antifúngica dos óleos essenciais sobre *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum musae*, por meio de cromatografia em camada delgada;

- avaliação do potencial de películas à base de fécula de mandioca e óleos essenciais (compostos fixos e voláteis) em combinação/associação ou não na conservação pós-colheita de frutos de goiabeira, com ênfase no controle de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente etiológico da antracnose;

- avaliação do efeito película à base de fécula de mandioca e de óleos essenciais sobre os eventos de infecção de *Colletotrichum gloeosporioides* em frutos de goiabeira (*Psidium guajava* L.), por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e

- avaliação do efeito de óleos essenciais sobre a ultraestrutura de *Colletotrichum gloeosporioides*, por meio de microscopia eletrônica de transmissão (MET).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Fruticultura no Brasil

O setor de fruticultura está entre os principais geradores de renda, emprego e desenvolvimento rural do agronegócio nacional. Por todo o país, existem espalhados pelo menos trinta grandes polos de produção de frutas. A demanda por mão-de-obra na fruticultura gera oportunidades de trabalho na razão de 2 a 5 trabalhadores para cada hectare cultivado nos diferentes elos da cadeia produtiva. O mercado mundial de frutas cresce, atualmente, à razão de US\$ 1 bilhão ao ano, em média (BUAINAIN; BATALHA, 2007).

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de frutas frescas (ANDRIGUETO; NASSER; TEIXEIRA, 2006; BUAINAIN; BATALHA, 2007), posição que tem como ponto de partida as condições favoráveis de clima, solo e disponibilidade de área do país e que vem sendo sustentada pelos investimentos públicos e privados em infraestrutura, capacitação, logística e inovação tecnológica (BUAINAIN; BATALHA, 2007).

No ranking de produção mundial de frutas, o país ocupa o terceiro lugar, atrás da China (175 milhões de toneladas) e da Índia (57 milhões de toneladas), com 43 milhões de toneladas, produzidas entre frutas tropicais, subtropicais e temperadas, ao longo de todo o ano. Do total produzido, 20 milhões de toneladas de frutas foram destinadas ao consumo *in natura*, distribuídas entre os mercados interno e externo. Os 23 milhões de toneladas restantes de frutas, representando 55% da produção total, foram processados e 12 milhões tiveram como destino o mercado internacional (BRASIL ALIMENTOS, 2009).

A exportação brasileira de frutas frescas não alcança 2% do mercado mundial (ALMEIDA, 2002; BUAINAIN; BATALHA, 2007).

O surgimento de nichos de mercado para a fruticultura tropical (mamão, manga, goiaba e abacaxi) e subtropical (laranja) e o aumento da demanda no

período de entressafra dos países do hemisfério norte geram oportunidades para a inserção e o incremento da participação do Brasil no mercado externo. O uso inadequado de agrotóxicos e a tecnologia de pós-colheita deficiente determinam o baixo padrão de qualidade das frutas sob o enfoque de exigências internacionais de um mercado importador concentrado e exigente, protegido por barreiras fitossanitárias, contribuindo para a reduzida inserção dos produtos tropicais no mercado de frutas frescas (ALMEIDA, 2002).

A qualidade certificada de frutas passou a ser uma exigência dos mercados importadores que, por meio de programas e legislações específicas, realizam o controle e a fiscalização permanente de toda a cadeia produtiva no país exportador (NAKA, 2001). A partir de 2003, a União Europeia passou a exigir certificação de qualidade das frutas importadas, certificação de produção integrada para frutas de clima temperado e em 2005, para todas as frutas (BOLETIM INFORMATIVO - FAEP).

As cadeias de distribuidores e de supermercados europeus, representadas pelo EUREPGAP (*Euro-Retailer Produce Working Group*, EUREP e *Good Agriculture Practices*, GAP), vêm pressionando exportadores de frutas e hortaliças para o estabelecimento de regras de produção que levem em consideração os resíduos de agroquímicos, meio ambiente e condições de trabalho e higiene (ANDRIGUETO; NASSER; TEIXEIRA, 2006).

A produção integrada de frutas (PIF) tornou-se uma exigência dos mercados importadores, principalmente da Comunidade Europeia, rigorosa em requisitos de qualidade e sustentabilidade, enfatizando a proteção do meio ambiente, a segurança alimentar, as condições de trabalho, a saúde humana e a viabilidade econômica (MORAES, 2002). Caracteriza-se como um sistema de produção que gera alimentos e demais produtos de alta qualidade, mediante o uso de recursos naturais e a regulação de mecanismos para a substituição de insumos poluentes (BOLETIM IOBC/WPRS, 1999).

Em março de 2006, a Associação Brasileira de Horticultura (ABH) registrou o lançamento do Sistema de Informações de Resíduos de Agrotóxicos em Horticultura (SIRAH), um banco de dados técnico-científicos com análises de resíduos de agrotóxicos em frutas e hortaliças frescas, como um marco importante em direção à produção de alimentos seguros e saudáveis para a população brasileira. Patrocinado pela Associação Nacional de Defesa Vegetal (ANDEF) e gerenciado pelo Centro de Qualidade em Horticultura da Companhia de Entrepostos e Armazéns Gerais de São Paulo (CEAGESP), o SIRAH, tem como objetivo a criação de um sistema nacional de informação sobre ocorrência de resíduos (princípios ativos e concentrações detectadas) e origem do produto (produtor, estado, município e permissionário). Para a criação do sistema, foram computadas as informações de 3.082 amostras de frutas e hortaliças frescas, coletadas no CEAGESP, no período entre janeiro de 1994 e abril de 2005, referentes a 52 produtos hortifrutícolas. As análises dos resíduos foram executadas pelo Laboratório de Resíduos de Pesticidas do Instituto Biológico (ABH/SIRAH, 2006).

Os resultados das análises possibilitaram uma interpretação comparativa entre os resíduos detectados e o defensivo registrado no Brasil, estabelecendo um meio de comunicação com permissionários, produtores e autoridades, permitindo comparações com os limites de resíduos internacionalmente aceitos (MELO, 2006).

Os limites máximos de resíduos (LMR) permitidos, fundamentais para o comércio internacional, são estabelecidos por órgãos governamentais competentes em cada país ou pelo Comitê de Resíduos de Pesticidas do Codex Alimentarius (CCRP), em âmbito internacional e adotados pela Organização Mundial de Comércio (OMC). Esse comitê é assessorado pela Reunião Conjunta em Resíduos de Pesticidas da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação/Organização Mundial de Saúde (FAO/OMS) (CHITARRA;

CHITARRA, 2005).

No Fruitlogistika 2010, em Berlim, um dos maiores eventos internacionais do setor de comercialização de frutas frescas, produtores da praça de exposição Instituto Brasileiro da Fruta - Agência Brasileira de Promoção de Exportações (IBRAF-APEX) chamaram a atenção com frutas tropicais das mais tradicionais às mais delicadas, despertando o interesse de grandes compradores pela qualidade de muitos produtos, apresentando, ainda, vantagem pela logística de distribuição “just in time” pela via aérea. Para a conclusão de negócios, a necessidade das certificações apresentou-se como fator diferenciador. A adoção das boas práticas agrícolas determinadas pela Produção Integrada de Frutas (PIF) confere aos exportadores brasileiros a certificação GlobalGAP requerida pelo mercado internacional, reafirmando posição de destaque desses no cenário europeu e consolidando o agronegócio brasileiro (BRASIL AGRO, 2010).

Assim, para que o Brasil avance na conquista dos mercados consumidores torna-se necessária a transformação imediata e contundente nos procedimentos de produção e pós-colheita de frutas (ANDRIGUETO; NASSER; TEIXEIRA, 2006), consistindo o desafio da fruticultura moderna na capacidade de gerar produtos de qualidade e saudáveis, em conformidade com os requisitos da sustentabilidade ambiental, da segurança alimentar e da viabilidade econômica, mediante a utilização de tecnologias não-agressivas ao meio ambiente e à saúde humana (ANDRIGUETO; KOSOSKI, 2002).

2.2 Origem, classificação botânica, importância alimentar, social e econômica da goiabeira (*Psidium guajava* L.)

A goiabeira *Psidium guajava*, devido à adaptação a diferentes condições edafoclimáticas e à facilidade da propagação por meio de sementes (GONZAGA NETO, 1990), está amplamente distribuída nos trópicos e subtropicais, tornando-

se nativa em muitas áreas, sendo, em algumas, considerada planta daninha (LIM; MANICON, 2003).

A origem asiática ou americana da goiabeira sempre foi um assunto muito discutido, persistindo a dúvida (GONZAGA NETO, 1990). As primeiras referências sobre a goiabeira datam do período compreendido entre 1514 e 1557, quando o cronista espanhol Oviedo esteve no Haiti, referindo-se à planta como “guayabo” e fez considerações sobre o seu comportamento vegetativo em algumas regiões das Índias (RUEHLE, 1964). Acredita-se, por outro lado, que foram os espanhóis que transportaram a goiabeira do Pacífico para as ilhas Filipinas e Índias, espalhando-se, então, para a Malásia, o Havá e a África do Sul (SOUBIHE SOBRINHO, 1951). Ochse (1966) cita que a goiabeira é nativa do Brasil, de onde se difundiu para todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo. Sem precisar a região, Koller (1979) refere-se à goiabeira como sendo originária de regiões de clima tropical.

No gênero *Psidium*, encontram-se agrupadas mais de 150 espécies, sendo todas consideradas plantas nativas da América, com espécies produtoras de frutos com grande número de sementes. A goiabeira (*Psidium guajava* L.), considerada a espécie mais importante, segundo classificação botânica, pertence à divisão *Spermatophyta*, subdivisão *Angiospermae*, classe *Dicotyledoneae*, ordem *Myrtilflorae*, subordem *Myrtineae* e família *Myrtaceae* (MANICA, 2000).

A cultura da goiabeira tem importância econômica e social no Brasil, em virtude das múltiplas formas de aproveitamento de seus frutos (MAIA; GARCIA; LEITE, 1988) e pela necessidade de mão-de-obra, praticamente durante o ano todo, em razão do prolongamento do período de safra e, conseqüentemente, com um número maior de colheitas e pela oferta de matéria-prima (goiabas) durante 8 ou 9 meses, o que propicia maiores oportunidades de emprego na indústria (GONZAGA NETO et al., 1982).

A “maçã dos trópicos”, denominação dada à goiaba em outros países,

tem a maior parte da produção consumida como fruta fresca e o restante processado na forma de goiabada, geleia, bala, suco, polpa, vinho, fruta seca e conservas (SALUNKHE et al., 1995).

A excelente qualidade da goiaba é atribuída ao elevado teor nutritivo, às excelentes propriedades organolépticas, ao alto rendimento por hectare e à polpa de elevada qualidade industrial. Rica em vitamina C, com valores seis a sete vezes superiores aos dos frutos cítricos (fonte tradicional dessa vitamina), não supera apenas as quantidades presentes na acerola, no camu-camu e no caju. Destaca-se, ainda, pelo elevado conteúdo de açúcares, vitamina A e vitaminas do grupo B (tiamina e niacina) e teores significativos de fósforo, ferro e cálcio. Com aroma e sabor característicos, possui alto teor de fibras que lhe confere a capacidade de alta digestibilidade (CARVALHO, 1994).

Os frutos da goiabeira são bagas de tamanho, forma e coloração da polpa variável, em função da variedade (KOLLER, 1979). Em um fruto de goiabeira, aproximadamente 20% correspondem à casca, 50% à polpa e 30% às sementes (ADSULE; KADAM, 1995).

Brasil, Índia e México destacam-se como principais produtores e Cuba, República Dominicana, Egito, Havaí, Jamaica, Quênia, Malásia, Filipinas, Porto Rico, Taiwan, Tailândia e Venezuela como importantes regiões produtoras (LIM; MANICON, 2003).

Em 2008, no Brasil, foram cultivados 15.743 hectares e colhidas 312.348 toneladas em 15.641 hectares de frutos de goiabeiras, destacando-se o estado de Pernambuco como o maior produtor nacional, com a produção de 96.733 toneladas, seguido pelos estados de São Paulo, com 89.772 toneladas e Pará, com 18.672 toneladas. O estado de Minas Gerais ocupou a 5ª colocação no ranking brasileiro de produção de goiabas (Tabela 1) (IBGE, 2009).

Tabela 1 Levantamento da produção agrícola municipal de frutos de goiabeiras (*Psidium guajava*, L.), segundo as grandes regiões brasileiras, em 2008.

Regiões	Estados	Área plantada (ha)	Área colhida (ha)	Quantidade produzida (toneladas)	Quantidade produzida (%)
Norte	Pará	1263	1263	18672	96
	Rondônia	69	69	529	3
	Amapá	10	10	145	1
	Amazonas	52	48	116	1
	Roraima	-	-	-	0
	Acre	-	-	-	0
	Tocantins	-	-	-	0
Nordeste	Pernambuco	3795	3728	96733	72
	Bahia	836	832	15757	12
	Ceará	702	702	7441	6
	Paraíba	598	598	4708	3
	Sergipe	347	347	4461	3
	Rio Grande do Norte	483	483	3370	2
	Piauí	159	159	2168	2
	Alagoas	40	40	267	0
Maranhão	14	14	111	0	
Sudeste	São Paulo	3765	3760	89772	72
	Minas Gerais	905	901	13519	11
	Rio de Janeiro	598	598	11946	10
	Espírito Santo	424	424	9964	8
Sul	Rio Grande do Sul	709	700	6745	56
	Paraná	351	351	5238	44
	Santa Catarina	3	3	18	0
Centro-Oeste	Goiás	249	249	10478	51
	Distrito Federal	317	314	9889	48
	Mato Grosso do Sul	37	37	243	1
	Mato Grosso	17	11	58	0

Fonte: IBGE, Produção Agrícola Municipal 2008. Rio de Janeiro: IBGE, 2009. NOTA 1: Atribui-se zero aos valores dos municípios onde, por arredondamento, os totais não atingem a unidade de medida. Adaptado por Rozwalka em fevereiro/2010

A comercialização de goiaba no Entrepósito Terminal de São Paulo (ETSP) da Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais de São Paulo (CEAGESP) apresenta-se como um ótimo retrato da produção brasileira. Em

2008, foram comercializadas, neste local, 11.726 toneladas (SIEM-CEAGESP, 2009). Segundo o PROHORT (2009), a comercialização no ETSP da CEAGESP movimentou 35,02 milhões de reais em 2008 e o total nas CEASAs monitoradas pelo sistema foi de 60,2 milhões de reais. É necessário lembrar que importantes centrais, como o Mercado do Produtor de Juazeiro e as demais CEASAs nordestinas ainda estão fora do sistema (WATANABE, 2009).

De acordo com o Comparativo das Exportações Brasileiras de Frutas Frescas elaborado pelo Instituto Brasileiro de Fruticultura (IBRAF), com dados fornecidos pela Secretaria de Comércio Exterior (SECEX), em 2008, o Brasil exportou 219.586 kg de goiabas (IBRAF, 2008).

A ausência de resíduos de agrotóxicos em goiabas, verificada pelo Sistema de Informações de Resíduos de Agrotóxicos em Horticultura (SIRAH) de 2002 a 2007, apresenta-se como um dos fatores mais relevantes para o incremento da participação brasileira no mercado de frutas frescas.

2.2 Antracnose em frutos de goiabeira (*Psidium guajava* L.)

A antracnose, causada por *Colletotrichum gloeosporioides* em frutos tropicais, como abacate, goiaba, mamão, manga e maracujá; na banana, por *Colletotrichum musae* e em frutos de clima subtropical e temperado, como maçã, uva, pêssego e kiwi por *Colletotrichum acutatum*, constitui um problema importante em pós-colheita (PERES et al., 2002), pois penetra nos frutos ainda verdes de várias espécies vegetais, permanecendo latente ou inativo até o amadurecimento, quando, devido à colonização, observa-se grande quantidade de lesões (AMORIM, 1995). Então, frutos que aparentam completa sanidade quando colhidos podem ser portadores de infecções latentes ou quiescentes, capazes de causar perdas significativas durante o armazenamento (JARVIS, 1994).

Em todos os países produtores de frutos de goiabeiras, a antracnose destaca-se como a doença mais comum em pré e pós-colheita, podendo causar consideráveis perdas pós-colheita (LIM; MANICON, 2003).

No Brasil, a antracnose, ou mancha-chocolate, em frutos de goiabeira, causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penzig) Arx (= *Gloeosporium psidii* Delacr.), cuja forma sexuada corresponde a *Glomerella cingulata* (Stonem) Spauld e Schrenk, apresenta-se como uma das doenças mais graves em pós-colheita (GORGATTI NETTO, 1996). O fungo, em estágio mitospórico (reprodução assexuada), pertence ao Reino Fungi, à divisão Eumycota, subdivisão Deuteromycotina, classe Coelomycetes, ordem Melanconiales e família Melanconiaceae. Apresenta teleomorfo ou fase sexuada no filo Ascomycota, subdivisão Ascomycotina, classe Ascomycetes, ordem Phyllachorales e família Glomerellaceae (KIRK et al., 2001).

Na cultura da goiabeira, o patógeno pode afetar folhas em qualquer fase de desenvolvimento, ramos novos, flores e frutos. Durante estações chuvosas, ocorre o crestamento dos ramos novos, que ficam de coloração púrpura, tornando-se pardo-escuros, secos e quebradiços. Em folhas e frutos, ocorre o aparecimento de áreas circulares de coloração escura. Quando a infecção se dá pelo botão floral, observa-se o escurecimento a partir do pedúnculo e parte ou todo o fruto apresenta podridão. Nos frutos com ataque precoce, na sua fase inicial, aparecem manchas circulares, secas, elevadas e de pústulas em forma de cancos. As lesões são deprimidas, encharcadas, de coloração marrom, principalmente em locais danificados por insetos e, em ataques mais severos, podem coalescer, resultando em uma grande mancha de formato irregular. A alta umidade favorece o desenvolvimento de uma massa de esporos de cor alaranjada sobre o centro da lesão. A área atacada não acompanha o crescimento do fruto e se rompe. A infecção não alcança a polpa, mas inutiliza os frutos para o mercado de consumo ao natural. No caso de infecção severa, os frutos tornam-se

mumificados e pretos. A penetração do fungo se dá pela cavidade floral, por meio de ferimentos causados por insetos ou durante o manuseio. Pela superfície intacta do fruto, ocorre a penetração direta pela prévia formação de apressórios. A temperatura ideal para que ocorra a infecção é de 22°C a 25°C (JUNQUEIRA, 2000).

Durante a colonização do hospedeiro, as espécies do gênero *Colletotrichum* exibem como estratégias de nutrição os modos biotrófico (nutrientes obtidos de células vivas do hospedeiro) e necrotrófico (nutrientes obtidos de células mortas pelo fungo no hospedeiro). As estratégias de infecção caracterizam-se pela colonização intracelular ou colonização subcuticular intramural/intraparede. Em ambos os casos, inicialmente, os conídios aderem e germinam na superfície da planta, produzindo tubos germinativos e, então, apressórios para a penetração da cutícula. Após a penetração subcuticular intramural, ocorre a formação de cadeia de hifas inter e intracelular que colonizam rapidamente o tecido e provocam a sua morte (PERFECT et al., 1999).

2.3 Manejo de doenças em pós-colheita

O período de pós-colheita é definido como um espaço de tempo indeterminado entre a colheita e o consumo, em que perdas substanciais de produtos podem ocorrer devido às podridões patológicas (DHINGRA, 1985).

Eckert e Ogawa (1985), em revisão, ressaltam que, além das perdas pós-colheita e da redução do valor nutricional de alimentos, consideradas principais preocupações, atenção deve ser dispensada a outras consequências da deterioração microbiana, muitas vezes negligenciadas, como a perda parcial ou total de embalagens para o consumidor, devido a uma ou a várias unidades doentes; a vida de armazenamento reduzida de culturas perecíveis devido ao

amadurecimento acelerado ou à senescência desencadeada pelo etileno em alguns frutos doentes no ambiente; a contaminação dos alimentos por micotoxinas; metabólitos tóxicos produzidos por tecidos de plantas doentes em resposta ao ataque de fungos ou de exposição ao etileno; o gosto inaceitável do produto ou produtos associados a plantas doentes e a desintegração de frutas processadas por enzimas pectinolíticas tolerante ao calor de patógenos pós-colheita.

Estratégias empregadas no controle pós-colheita de doenças abrangem redução do inóculo, prevenção e erradicação de infecções no campo, inativação de infecções por ferimentos e supressão do desenvolvimento e propagação da doença (ECKERT; OGAWA, 1985). O controle após a colheita tem como objetivos evitar que os patógenos latentes nos tecidos causem podridões e impedir novas infecções (BETTIOL; GHINI, 1995).

Em muitos casos, o controle químico de doenças de plantas, apresenta-se como a única medida eficiente e economicamente viável para garantir produtividade e qualidade visadas pela agricultura moderna (KIMATI, 1995). Os fungicidas constituem a principal medida de controle de doenças em pós-colheita (ECKERT; OGAWA, 1985; TRIPATHI; DUBEY, 2004; SHARMA; TRIPATHI, 2006).

Em pós-colheita, os frutos são imersos em caldas ou recobertos por invólucros contendo fungicidas antes do armazenamento e acondicionados em caixas previamente desinfestadas. No estado de São Paulo, uma prática rotineira consiste na desinfestação preventiva de veículos, equipamentos, material de colheita e transporte, *packing-house* com produtos à base de cloro, formaldeído e álcoois. A escolha de um fungicida para ser usado em pós-colheita depende da sensibilidade do patógeno, da habilidade do composto químico em penetrar no interior do tecido do hospedeiro, atingindo o sítio de infecção e da tolerância da cultura ao fungicida em relação à fitotoxicidade e à qualidade do produto

(AZEVEDO, 2007).

O uso de produtos químicos sintéticos para controlar a deterioração pós-colheita tem sido restrito devido à sua carcinogenicidade, teratogenicidade e toxicidade residual alta e aguda, ao longo período de tempo para degradação, à poluição ambiental e aos seus efeitos sobre os alimentos e outros efeitos colaterais em seres humanos (LINGK, 1991; UNNIKRISSAN; NATH, 2002). O uso contínuo de fungicidas pode ainda promover a seleção de fungos patogênicos resistentes (GHINI; KIMATI, 2002). O desenvolvimento de resistência por populações de patógenos de pós-colheita apresenta-se como um problema significativo (REIMANN; DEISING, 2000).

A contaminação de produtos hortícolas por resíduos de agrotóxicos tem sido alvo da mídia, causando impactos negativos à cadeia produtiva das frutas e hortaliças. Na raiz desse problema, encontra-se a aplicação de agrotóxicos em dosagem excessiva ou de produtos não recomendados (MELO, 2006), tanto em pré como em pós-colheita. A falta de registro de fungicidas apresenta-se como um dos entraves à comercialização de frutas e legumes para o mercado europeu (AMORIM; MARTINS, 2006).

A União Europeia vem retirando do mercado grande parte dos ingredientes ativos dos produtos agroquímicos registrados para frutas, mediante trabalho realizado desde a década de 1990 (BUAINAIN; BATALHA, 2007). Nos Estados Unidos, Captan e Benomil, entre outros fungicidas, foram proibidos pela U.S. Environmental Protection Agency ou retirados voluntariamente do mercado, em função de um relatório elaborado pela National Academy Sciences, em 1987, sobre os riscos à saúde associados ao uso de fungicidas (WISNIEWSKI; WILSON, 1992).

Segundo informações do registro de agrotóxicos e afins, constantes no Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (AGROFIT), em acordo com as bulas aprovadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento -

Coordenação-Geral de Agrotóxicos e Afins/DFIA/SDA, atualmente, não há produtos registrados para uso em pós-colheita para a cultura da goiabeira. Em pré-colheita, encontram-se registrados, para o controle da antracnose causada pelo patógeno *Colletotrichum gloeosporioides*, oito produtos, sendo dois à base de óxido cuproso (inorgânico), três à base de oxiclreto de cobre (inorgânico) e um à base de tebuconazol (triazol) + trifloxistrobina (estrobilurina) (AGROGIT/MAPA, 2010).

Ainda que a cultura da goiabeira seja submetida ao controle químico, as perdas significativas decorrentes de antracnose ocasionam redução do período de comercialização, desclassificação e descarte de produtos, comprometendo o aspecto econômico, evidenciando a ineficiência dos tratamentos químicos realizados em pré-colheita.

Nesse contexto, em concordância com Wisniewski e Wilson (1992), faz-se necessário e urgente o desenvolvimento de métodos alternativos e eficazes mediante o uso de técnicas não químicas e tratamentos com fungicidas não seletivos para o controle de doenças pós-colheita, considerados seguros pelos consumidores, não apresentando risco para a saúde humana e meio ambiente.

Diante do exposto, a prática da agricultura alternativa, também chamada de agricultura sustentável que busca medidas de controle de doenças que minimizem o impacto ao ambiente e ao homem (ZADOKS, 1992), tornou-se imprescindível, apresentando-se o controle alternativo de doenças em plantas como uma boa opção, nos dias atuais.

Dentre os métodos alternativos de controle de doenças de plantas, no sentido de alternativa aos fungicidas, utilizados com sucesso no Brasil encontram-se o controle físico (solarização do solo e coletor solar para desinfestação de substratos), o controle biológico (*Trichoderma* para o controle de patógenos habitantes do solo; premunização para o controle do mosaico da abobrinha e da tristeza-dos-citros) e os produtos alternativos (leite cru para o

controle do oídio da abobrinha, pepino, pimentão, roseiras e em viveiros de *Eucalyptus*; a casca de camarão para o controle de podridão de raízes causada por *Fusarium* spp.; os biofertilizantes produzidos pela digestão anaeróbia ou aeróbia de material orgânico possuem microrganismos que produzem metabólitos; os sais, como o bicarbonato de sódio, para o controle de oídio e os extratos de plantas, como os taninos, obtidos de acácia-negra para o controle de fusariose do abacaxizeiro) (BETTIOL; GHINI, 2004).

Em pós-colheita de frutos de goiabeiras, encontram-se, na literatura, trabalhos demonstrando a eficiência da aplicação de cloreto de cálcio (WERNER et al., 2009; LINHARES et al., 2007; XISTO et al., 2004), 1-metilcloropropeno (CERQUEIRA et al., 2009; LINHARES et al., 2007; BASSETTO; JACOMINO; PINHEIRO, 2005), coberturas comestíveis com gelatina, triacetina e ácido láurico (FAKHOURI; GROSSO, 2003) e à base de fécula de mandioca (VILA et al., 2007; OLIVEIRA; CEREDA, 1999), enfatizando, principalmente, a manutenção da qualidade em relação às características físico-químicas, não sendo observados estudos direcionados ao efeito desses produtos no controle de fitopatógenos.

Importante ressaltar que, para a obtenção de eficiência do controle de doenças em pós-colheita dos frutos de goiabeiras, considerando o reduzido período de conservação de poucas semanas, estratégias devem ser estabelecidas com base no processo de maturação. Por se tratar de uma fruta climatérica (BROWN; WILLS, 1983), a goiaba apresenta, durante o processo de maturação, um pico de atividade respiratória, denominado de respiração climatérica (TUCKER, 1993), ocorrendo os picos de gás carbônico (CO₂) e etileno cinco a seis dias após a colheita (ADSULE; KADAM, 1995).

Diante do exposto, para o controle de doenças em pós-colheita com aumento da vida de prateleira e manutenção das características físico-químicas dos frutos de goiabeiras, uma possibilidade baseia-se na exploração da atividade

biológica de compostos naturais biologicamente ativos em óleos essenciais presentes em plantas medicinais, condimentares, ornamentais e florestais e outros produtos alternativos, como fécula de mandioca, formando películas.

Cabe ainda ressaltar que a inibição do crescimento microbiano pode ser obtida pelo efeito sinérgico da combinação de vários fatores ou obstáculos, em vez de ser alcançada pela aplicação drástica de um único fator de conservação (LEISTNER, 1992). A utilização de películas comestíveis como obstáculo ao crescimento microbiano foi mencionada por Leistner e Gorris (1995).

Assim, a tecnologia de métodos combinados (TMC), também conhecida como tecnologia de obstáculos (*hurdle technology*), que se baseia na combinação de dois ou mais obstáculos ao crescimento microbiano, aplicados em baixos níveis, para promover a estabilidade do alimento em temperatura ambiente (ALZAMORA et al., 1993), apresenta-se como mais uma possibilidade promissora para o manejo de doenças em pós-colheita.

2.4 Óleos essenciais no controle de fitopatógenos

No metabolismo vegetal, por meio de diversas rotas biossintéticas elaboradas, frequentemente desconhecidas, são produzidos os metabólitos secundários, ou micromoléculas, geralmente de estrutura complexa, baixo peso molecular, atividades biológicas marcantes e que, diferentemente dos metabólitos primários ou macromoléculas (lipídeos, protídeos e glicídeos) essenciais a todos os seres vivos, com funções vitais definidas, apresentam-se em baixas concentrações e em determinados grupos de plantas (POSER; MENTZ, 2000).

Na natureza, os óleos essenciais desempenham papel importante na proteção das plantas contra bactérias, vírus, fungos, insetos e ataque de herbívoros. Também podem atrair alguns insetos para favorecer a dispersão de

pólen e sementes ou repelir outros indesejáveis. Como metabólitos secundários, os óleos essenciais podem ser sintetizados por toda a planta, ou seja, em brotos, flores, folhas, caules, galhos, sementes, frutos, raízes, madeira ou cascas e armazenados em células secretoras, cavidades, canais, células da epiderme ou tricomas glandulares (BAKKALI et al., 2008).

Uma vasta gama de compostos orgânicos naturais de origem vegetal, produtos do metabolismo primário e secundário, demonstra-se biologicamente ativa pelas ações tranquilizante, analgésica, anti-inflamatória, citotóxica, anticoncepcional, antimicrobiana, antiviral, fungicida e inseticida, dentre outras (PLETSCH, 1998).

Os óleos essenciais têm sido largamente utilizados por suas propriedades já observadas na natureza, ou seja, pelas atividades antibacteriana, antifúngica e inseticida. Atualmente, cerca de 3.000 óleos essenciais são conhecidos, dos quais 300 são comercialmente importantes, especialmente para a indústria farmacêutica. Também são utilizados em perfumes e produtos de maquiagem, produtos sanitários em odontologia, na agricultura, como conservantes, aditivos alimentares e remédios naturais (BAKKALI et al., 2008).

A principal característica dos óleos essenciais é a volatilidade que os difere dos óleos fixos (mistura de substâncias lipídicas), obtidos geralmente de sementes (SIMÕES; SPITZER, 2000), por prensagem. Na natureza, a difusão de traços de compostos voláteis pode induzir ou inibir a germinação ou o crescimento, ou desencadear alterações no desenvolvimento em plantas e fungos (FRENCH, 1992).

Os óleos voláteis são definidos pela International Standard Organization (ISO) como produtos obtidos de partes de plantas por meio de destilação por arraste de vapor d'água ou por expressão (prensagem), no caso de pericarpos de frutos cítricos. Em função das características físico-químicas, recebe as seguintes denominações: óleo, devido à aparência oleosa em temperatura

ambiente; essências, pelo aroma agradável e intenso e etéreo, *aetheroleum* em latim, pela solubilidade em solventes orgânicos apolares, como éter, porém, em água apresentam solubilidade limitada. Outras características referem-se ao sabor, geralmente acre (ácido) e picante, à cor ligeiramente amarelada, sendo incolores quando recentemente extraídos ou em número reduzido ou coloridos, como o óleo da camomila azulado, devido ao alto teor de azulenos e não são muito estáveis, na presença de ar, luz, calor, umidade e metais (SIMÕES; SPITZER, 2000).

Os óleos essenciais são misturas complexas que podem conter cerca de 20 a 60 componentes em concentrações muito diferentes. São caracterizados por dois ou três componentes que se apresentam em concentrações relativamente elevadas (20% a 70%), em comparação aos traços presentes de outros. Com baixos pesos moleculares, os compostos encontram-se distribuídos em grupos de terpenos e terpenoides (principal grupo), de aromáticos e constituintes alifáticos. As moléculas de monoterpênos (C10) representam 90% da composição dos óleos essenciais, com grande variedade de estruturas e várias funções, tais como: carbonetos acíclicos (ocimeno, mirceno), monocíclicos (terpinenos, *p*-cimeno, felandrenos) e bicíclicos (pinenos, -3-careno, sabineno, canfeno); álcoois acíclicos (geraniol, linalol, citronelol, lavandulol, nerol), monocíclicos (mentol, α -terpineol, carveol) e bicíclicos (borneol, fenchol, crisantenol, 3-tujanol); aldeídos acíclicos (geranial, neral, citronelal); cetonas acíclicas (tegetone), monocíclicas (mentonas, carvona, epóxi, piperitona) e bicíclicas (cânfora, fenchona, tujona, ombelulona, pinocanfona, pinocarvona); ésteres acíclicos (acetato ou propionato de linalil, acetato de citronelil), monocíclicos (mentil ou α -terpinil acetato) e bicíclicos (acetato de isobornil); éteres (1,8-cineol, mentofurano); peróxidos (ascaridol) e fenóis (timol, carvacrol). Os sesquiterpenos (C15) são semelhantes aos monoterpênos em estrutura e função, sendo encontrados na composição dos óleos os carbonetos (α -azuleno, β -

bisaboleno, cadinenos, β -cariofileno, logifolene, curcumenos, elemenos, farnesenos, zingibereno), os álcoois (bisabol, cedrol, β -nerolidol, farnesol carotol, β -santalol, patchoulol, viridiflorol), as cetonas (nootkatone, germacreno, *cis*-longipinan-2,7-dione, β -vetinone, turmeronas) e os epóxidos (óxido de cariofileno, epóxido de humuleno). Os compostos aromáticos ocorrem com menos frequência do que os terpenos e incluem aldeído (cinamaldeído), álcool (álcool cinâmico), fenóis (chavicol, eugenol), derivados metóxi (anetol, elemicina, estragol, metileugenóis) e compostos dióxido de metileno (apiol e miristicina) (BAKKALI et al., 2008).

Diante da complexidade dos óleos essenciais, admite-se que existem vários mecanismos de ação não conhecidos exatamente, podendo a inibição de patógenos ocorrer pela desnaturação de proteínas, a inibição de enzimas e/ou a desintegração de membranas (JANSSEN, 1989).

Trabalhos desenvolvidos com extratos brutos ou óleos essenciais obtidos a partir de plantas medicinais da flora nativa têm indicado o potencial das mesmas no controle de fitopatógenos, tanto por sua ação fungitóxica direta, inibindo o crescimento micelial e a germinação de esporos, quanto pela ativação de mecanismos de defesa como a indução de fitoalexinas, indicando a presença de composto(s) com característica de elicitador(es) (STANGARLIN, et al., 1999).

Kulakiotu, Thanassouloupoulos e Sfakiotakis (2004) ressaltam que a utilização de produtos naturais obtidos de plantas pode ser considerada como uma possibilidade para o controle de doenças em pós-colheita, representando menor risco para a saúde humana e o ambiente. Nesse contexto, os óleos essenciais e seus compostos poderiam ser utilizados como medida de controle de doenças na agricultura alternativa.

Nos trabalhos citados a seguir, exemplifica-se a ação direta de óleos essenciais e seus compostos sobre agentes patogênicos.

Bhaskara Reddy et al. (1998) verificaram a inibição de *Botrytis cinerea*

(26,5% a 63,5% e 36,9% a 90,5%) e *Rhizopus stolonifer* (5,5% a 50,5% e 11,5% a 65,8%), patógenos comuns de armazenamento de morangos (*Fragaria ananassa*), pelos compostos voláteis dos tipos clonais Laval-1 e Laval-2, nas concentrações de 50 a 200 ppm do óleo essencial de *Thymus vulgaris* (tomilho), respectivamente, *in vitro*. Na presença de compostos voláteis de *T. vulgaris* obtidos dos clones Laval-1 e Laval-2, observou-se o controle de *Botrytis cinerea* (73,6% e 75,8%) e *Rhizopus stolonifer* (73,0% e 74,8%) em morangos, relacionando a maior atividade antifúngica de Laval-2 a 200 ppm (66,2%) ao conteúdo relativamente mais elevado dos compostos antimicrobianos *p*-cimeno, linalol, 4-terpinenol e timol que em Laval-1 a 200 ppm (53,5%). Nenhum sintoma visual de fitotoxicidade foi observado durante o período de avaliação.

Chu, Liu e Zhou (2001) observaram redução significativa de *Monilinia fructicola* (podridão parda) de 21% para 12%, mas nenhum efeito sobre *Penicillium expansum* (mofo azul), após 13 dias a 10°C, em cerejas ‘Hedelfingen’ (*Prunus avium* L.) inoculadas e fumigadas com 10 mg.L⁻¹ de timol antes do armazenamento a frio. *P. expansum* foi reduzido significativamente, de 16% para 2%, pela fumigação de ácido acético, a 6 ou a 10 mg.L⁻¹, que não apresentou efeito na redução da podridão parda. Verificaram, ainda, que a fumigação não teve efeitos sobre a firmeza, sólidos solúveis totais e acidez titulável das cerejas. Em comparação ao controle, observaram que a fumigação a 2 ou a 6 mg.L⁻¹ de timol não acelerou escurecimento dos pedúnculos, entretanto, a 10 mg.L⁻¹, causou escurecimento quase total. O ácido acético não apresentou nenhum impacto na descoloração dos pedúnculos. Os autores concluíram que a fumigação com ácido acético ou timol em baixas concentrações apresenta potencial para o controle de doenças pós-colheita, sem provocar efeitos adversos sobre a qualidade do fruto.

Singh et al. (2002) avaliaram a atividade antifúngica de vapores de monoterpenos puros contra quatro fungos patogênicos da cana pelo método da

placa de Petri invertida. Entre os monoterpenos testados, observaram a inibição total do crescimento micelial de *Curvularia pallescens* na presença de mentol a 2.000 ppm e linalol a 3.000 ppm e de *Colletotrichum falcatum*, pelo geraniol, a 3.000 ppm.

Ranasinghe, Jayawardena e Abeywickrama (2002) verificaram que óleos essenciais de *Cinnamomum zeylanicum* (L.) (canela) extraído da casca e das folhas e *Syzygium aromaticum* (L.) (cravo) apresentaram efeito fungistático e fungicida sobre crescimento micelial de *Colletotrichum musae*, agente etiológico da antracnose e da podridão-da-coroa em banana, também causada por *Lasiodiplodia theobromae* e *Fusarium proliferatum* no intervalo de 0,03%-0,11% (v/v), demonstrando maior eficiência que o fungicida benomil (0,7%-1,2% v/v), *in vitro*. Por meio de cromatografia gasosa, identificaram, como principais constituintes, cinamaldeído (50,5%), acetato de cinamila (8,7%), β -cariofileno (7,5%), 1,8 cineole (5,2%) e eugenol (4,7%), no óleo de canela extraído da casca; eugenol (76,9%), β -cariofileno (3,5%), benzil benzoato (2,8%), cinamaldeído (2,7%) e linalol (2,2%), no óleo de canela extraído de folhas e eugenol (79,2%), eugenil acetato (10,4%) e β -cariofileno (7,5%).

Shahi et al. (2003) comprovaram o potencial do óleo de *Cymbopogon flexuosus* contra patógenos pós-colheita. A ação fungicida do óleo de *Cymbopogon flexuosus* foi verificada nas concentrações mínimas de 0,2 $\mu\text{l.mL}^{-1}$, para *Alternaria alternata*, 0,4 $\mu\text{l.mL}^{-1}$ para *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. parasiticus*, *Cladosporium cladosporioides*, *Colletotrichum capsici*, *C. falcatum*, *Curvularia lunata*, *Fusarium cerealis*, *F. culmorum*, *F. oxysporum*, *F. udum*, *Gloeosporium fructigenum*, *Penicillium expansum*, *P. italicum*, *P. implicatum*, *P. digitatum*, *P. minio-luteum*, *P. variable* e 0,5 $\mu\text{l.mL}^{-1}$ para *Botrytis cinerea*, *Helminthosporium oryzae*, *H. maydis*, *Phoma violácea* e *Rhizopus nigricans*. *In vivo*, nos frutos tratados com o óleo de *Cymbopogon flexuosus* a 20 $\mu\text{l.mL}^{-1}$, antes da inoculação, observaram 100% de controle de

podridão. Para os frutos tratados após a inoculação, para controle total, foi necessária a concentração de $30 \mu\text{l.mL}^{-1}$. Até a concentração de $50 \mu\text{l.mL}^{-1}$, não observaram qualquer efeito fitotóxico sobre a casca de frutas de *Malus pumilo*.

Plotto, Roberts e Roberts (2003) verificaram inibição total de *Botrytis cinerea* e *Alternaria arborescens* na presença dos vapores dos óleos de tomilho, orégano e capim-limão. *Geotrichum candidum* foi inibido parcialmente por citral em meio de cultura e contido nos vapores dos óleos de tomilho e de orégano. Apenas os vapores do óleo de tomilho e orégano inibiram *Rhizopus stolonifer*. Quando incorporados, os óleos essenciais de tomilho, orégano e coentro apresentaram atividade antifúngica a 500 mg.L^{-1} sobre todos os fungos. O efeito de capim-limão foi verificado apenas a 1.000 mg.L^{-1} , não promovendo a inibição de *Rhizopus stolonifer*. Identificaram carvacrol, timol, citral e *trans*-2-decenal como principais componentes dos óleos essenciais de orégano, tomilho, capim-limão e coentro, respectivamente. *Trans*-2-decenal apresentou-se fungicida para *Botrytis cinerea*, *Alternaria arborescens* e *Geotrichum candidum* como vapor, mas perdeu a atividade quando incorporado ao meio de crescimento. Nos tomates inoculados, os vapores não demonstraram eficiência no controle das doenças e alguns induziram a fitotoxicidade em longos períodos de exposição. A redução do desenvolvimento *B. cinerea* e *A. arborescens* nos tomates inoculados foi verificada nos tratamentos de imersão nas emulsões dos óleos de tomilho e orégano, a 5.000 ppm e a 10.000 ppm.

Em um sistema fechado, Edris e Farrag (2003) observaram que os vapores dos óleos essenciais de hortelã-pimenta e manjericão e seus principais componentes, mentol e mentona, e linalol e eugenol, respectivamente, separadamente e misturados em diferentes proporções, inibiram de maneira dose-dependente o crescimento dos fungos *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizopus stolonifer* e *Mucor* sp., que causam deterioração e grandes perdas de pêssego durante a comercialização, o transporte e o armazenamento. Ao mentol foi

atribuída a propriedade antifúngica do óleo essencial de hortelã-pimenta, enquanto mentona sozinho não demonstrou nenhum efeito em todas as doses. No caso do óleo de manjeriço, linalol, individualmente, demonstrou moderada atividade antifúngica, enquanto eugenol não mostrou nenhuma atividade sobre os patógenos. A mistura dos dois componentes, em proporção semelhante à sua concentração no óleo original, proporcionou melhoria nas propriedades antifúngicas do óleo de manjeriço, indicando um efeito sinérgico.

Tripathi et al. (2004) verificaram atividade fungitóxica dos óleos essenciais de *Mentha arvensis*, *Ocimum canum* e *Zingiber officinale* contra *Penicillium italicum*, agente etiológico do mofo-azul em laranjas e limões, *in vitro*. Durante o armazenamento, observaram a aplicabilidade prática dos óleos essenciais no controle da podridão mofo azul de laranjas e limões. As laranjas e os limões apresentaram vida de prateleira aumentada em 6 e 8 dias, quando tratados com o óleo de menta, respectivamente; em 6 dias com o óleo de *Ocimum canum* e em 4 e 8 dias com *Zingiber officinale*, respectivamente.

Viegas et al. (2005) verificaram que óleos essenciais de casca de canela (*Cinnamomum zeylanicum* Breym.) e de bulbilho de alho (*Allium sativum* L.) promoveram maior inibição do desenvolvimento micelial de *Aspergillus flavus*, responsável pela síntese de aflatoxina em amendoim, que o fungicida sintético benomil, durante 12 meses. O efeito inibitório variou entre os 37 isolados testados.

Ranasinghe, Jayawardena e Abeywickrama (2005) observaram o controle de podridão da coroa em bananas 'Embul' (*Musa AAB*) maduras tratadas com emulsões de óleos essenciais da casca e de folhas de *Cinnamomum zeylanicum* (canela). O óleo de *Syzygium aromaticum* (cravo) não inibiu o desenvolvimento do patógeno. Verificaram, ainda, que as emulsões dos óleos de canela, combinadas com embalagem de polietileno de baixa densidade (0,075 mm, LDPE) constituindo uma atmosfera modificada, prolongam a vida útil de

armazenamento das bananas em até 21 dias em câmara fria a $14\pm 1^{\circ}\text{C}$ e em 14 dias a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$, sem afetar as propriedades organolépticas e físico-químicas.

Soylu, Soylu e Kurt (2006) constataram a atividade antifúngica das fases voláteis dos óleos essenciais de orégano (*Origanum syriacum* var. *Bevanii*) e tomilho (*Thymbra spicata* subsp. *spicata*), a partir de $0,3 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de ar; de funcho (*Foeniculum vulgare*), a $0,4 \mu\text{g.mL}^{-1}$; de alecrim (*Rosmarinus officinalis*), a $1,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$; de alfazema (*Lavandula stoechas* subsp. *stoechas*), a $1,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e de louro (*Laurus nobilis*), a $2,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de ar, mediante inibição total do crescimento micelial de *Phytophthora infestans*. Inibição total também foi observada nas fases de contato dos óleos essenciais de orégano, tomilho e funcho, a partir de $6,4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e de alecrim, alfazema e louro, a 12,8, 25,6, 51,2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. A produção de esporângios também foi inibida pelos óleos essenciais testados. Em cromatógrafo a gás acoplado a detector de massas analisaram a composição dos óleos, identificando, como principais compostos, carvacrol (79,8%), *p*-cimeno (8,2%) em orégano (24%), carvacrol (37,9%), *p*-cimeno (18,3%), linalol (15,9%), γ -terpineno (14,7%) em tomilho (16%), *trans*-anetol (82,8%), 4-alil-anisol (6,5%), limoneno (5,8%) em funcho (17%), borneol (20,4%), cânfora (19,5%), 1,8-cineol (17,4%), linalol (6,1%) em alecrim (30%), cânfora (20,2%), 1,8-cineol (35,5%), α -tujona (15,9%), fenchona (13,5%) em alfazema (21%) e 39 1,8-cineol (35,5%), sabineno (15,0%), α -terpinil acetato (14,2%), α -pineno (7,5%) em louro.

Sharma e Tripathi (2006) constataram a fungitoxicidade total do óleo essencial extraído do epicarpo do *Citrus sinensis* como volátil e pela técnica denominada comida envenenada (*poisoned food*), que consiste na incorporação do óleo em meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar) sobre germinação e crescimento micelial dos patógenos pós-colheita *Aspergillus niger* e *Botryodiplodia theobromae* isolados de manga; *Alternaria alternata*,

Cladosporium fulvum e *Botrytis cinerea*, de tomate; *Penicillium expansum* e *Alternaria Mali*, de maçã; *Penicillium chrysogenum* e *Cladosporium cladosporioides*, de uvas e *Myrothecium roridum*, de melão-de-são-caetano. Em cromatografia gasosa e espectrometria de massa (GC-MS), α -pineno (0,9%), β -pineno (0,6%), myrceno (4,1%), limoneno (84,2%), linalol (4,4%), citral (0,5%), α -terpineol (0,8%), terpinoleno (1,3%), citronelal (1,9%) e geraniol (1,3%) foram identificados no óleo.

Neri, Mari e Brigati (2006) observaram atividade antifúngica expressiva dos compostos voláteis *trans*-2-hexenal, carvacrol, *trans*-cinamaldeído e citral sobre o crescimento micelial e germinação esporulação de *Penicillium expansum*, agente etiológico do mofo azul de pera. Os compostos hexenal, (-)-carvona, *p*-anisaldeído, eugenol e 2-nonanone apresentaram inibição progressivamente menor. Os melhores inibidores de germinação e do crescimento micelial foram *trans*-2-hexenal e carvacrol, respectivamente. *In vivo*, verificaram que o *trans*-2-hexenal (12,5 $\mu\text{L.L}^{-1}$) aplicado como fumigante contra *P. expansum* em peras cv. Conference foi o melhor controle, quando aplicado durante um período 24 horas, 24 horas após a inoculação. Carvacrol (12,5-200 $\mu\text{L.L}^{-1}$), e *trans*-cinamaldeído (50-400 $\mu\text{L.L}^{-1}$) foram ineficazes e citral (200 $\mu\text{L.L}^{-1}$) demonstrou efeito moderado.

Azizi et al. (2006) avaliaram a atividade antifúngica dos óleos essenciais de *Thymus vulgaris*, *Mentha piperita*, *Satureja hortensis*, *Cuminum cyminum* e *Trachyspermum copticum*, nas concentrações de 250, 500 e 1.000 mg.L^{-1} , sobre o crescimento micelial e a germinação dos esporos de *Penicillium italicum*, *P. digitatum* e *Alternaria citri*, importantes fungos pós-colheita em citrus. Observaram que o crescimento radial de *Penicillium italicum* foi completamente inibido por *Thymus vulgaris* a 500 mg.L^{-1} , *Satureja hortensis* e *Trachyspermum copticum* a 1.000 mg.L^{-1} e reduzido a 57,17% e a 36,8%, quando exposto aos óleos essenciais de *C. cuminum* e *M. piperita*, a 1.000 mg.L^{-1} , respectivamente.

O crescimento radial do *P. digitatum* foi completamente inibido por *Thymus vulgaris*, *Trachyspermum copticum* a 500 mg.L⁻¹ e *Satureja hortensis* a 1.000 mg.L⁻¹ e reduzido a 22,8% e a 12,15%, pelos óleos essenciais de *C. cuminum* e *M. piperita*, respectivamente. A inibição total de *A. citri* foi verificada na presença de *Thymus vulgaris* (250 mg.L⁻¹), *Trachyspermum copticum* e *Satureja hortensis* (500 mg.L⁻¹), *C. Cuminum* (1000 mg.L⁻¹). *M. piperita* (1000 mg.L⁻¹) reduziu o crescimento radial de *A. citri* a 59,44%.

Tzortzakis (2007) verificou a redução de deterioração em morango (*Fragaria ananassa* Duch.) e tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) tratados com vapores dos óleos de *Eucalyptus globulus* L. (eucalipto) e *Cinnamomum zeylanicum*, Blume (canela). Durante e após a exposição ao vapor, os frutos foram mantidos a 13°C. Observou, ainda, que a firmeza dos tomates foi mantida apenas durante o período de exposição ao óleo de canela, não persistindo no armazenamento em ar ambiente. Nenhum efeito sobre a firmeza foi verificado pela exposição de tomates e morangos ao vapor do óleo de eucalipto e morangos ao vapor do óleo de canela. Os vapores dos óleos de canela e eucalipto estimularam os níveis de sólidos solúveis totais de tomates e morangos durante a exposição, persistindo o efeito apenas para tomates 'cereja' após a exposição. Observou que a perda de peso, o teor de ácidos orgânicos, a doçura e o conteúdo de fenóis totais, durante e após a exposição dos frutos de tomates e morangos aos óleos, não diferiram dos controles.

Tzortzakis e Economakis (2007) observaram redução significativa no desenvolvimento das colônias de *Colletotrichum coccodes*, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium herbarum*, *Rhizopus stolonifer* e *Aspergillus Níger*, entre 25 e 500 ppm; inibição completa de esporulação a 500 ppm e reduzida até 70% a 25 ppm em comparação ao controle; na presença do vapor do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* L.), *in vitro*. A redução da germinação dos esporos e o comprimento dos tubos germinativos em *C. coccodes*, *B. cinerea*, *C.*

herbarum e *R. stolonifer* foi dose dependente. A 100 ppm, verificaram o aumento de germinação de *A. niger*. Concluíram que o uso do óleo essencial puro de capim-limão constitui uma ferramenta inovadora e útil como alternativa ao uso de fungicidas sintéticos ou de outras técnicas de sanitização no armazenamento/embalagem.

Lee et al. (2007), avaliando os efeitos inibitórios dos compostos voláteis de 39 óleos essenciais, na concentração de 1 μL por placa, verificaram inibição do crescimento micelial de *Botrytis cinerea* e *Colletotrichum gloeosporioides*, fungos patogênicos em pós-colheita e de *Fusarium oxysporum*, *Pythium ultimum* e *Rhizoctonia solani*, fungos patogênicos de solo. O óleo essencial de *Origanum vulgare* inibiu o crescimento micelial de todos os cinco fungos testados, *Cuminum cyminum* e *Eucalyptus citriodora*, exceto de *C. gloeosporioides*. *Thymus vulgaris* suprimiu o crescimento micelial de *C. gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum* e *Rhizoctonia solani* e *Cymbopogon citratus*, apenas de *Fusarium oxysporum*. As composições químicas dos óleos essenciais foram determinadas por gás cromatografia e espectrometria de massa e os principais componentes encontrados foram β -pineno (23%), γ -terpineno (19%) e cuminaldeído (18%) em *C. cuminum*; geranial (43%), neral (30%) e limoneno (10%) em *C. citratus*; citronelal (73%) e isopulegol (6,7%) em *E. citriodora*; carvacrol (59%), ρ -cimeno (22%) e timol (6,5%), em *O. vulgare* e timol (38%), ρ -cimeno (30%) e γ -terpineno (6,7%) em *T. vulgaris*. Em frutos de maçã inoculados, observaram que o óleo essencial de *E. citriodora*, a 4 e a 8 $\mu\text{L.L}^{-1}$ de ar (28 e 56 μL por container) suprimiu o desenvolvimento de lesões de *Botrytis cinerea* (mofo-cinza) em 38% e 59%, respectivamente, e a redução das lesões em 19% e 37%, por *C. cuminum* a 5 e a 10 $\mu\text{L.L}^{-1}$ de ar (35 e 70 μL por contêiner), respectivamente. O aumento das doses aplicadas de óleos essenciais reduziu a incidência da doença.

Neri et al. (2007), avaliando nove compostos voláteis de plantas na fase

de vapor, verificaram a maior atividade fungicida de *trans*-2-cinamaldeído hexenal, carvacrol e citral, enquanto *trans*-hexenal, (-)-carvona, eugenol, 2-nonanone, e *p*-anisaldeído exibiram inibição progressivamente inferior sobre a germinação de conídios e crescimento micelial de *Monilinia laxa*, agente etiológico da podridão parda em frutos de caroço, *in vitro*. O melhor inibidor da germinação de conídios foi *trans*-2-hexenal, apresentando ED₅₀ igual a 7,53 e ED₉₅ igual a 9,4 $\mu\text{L.L}^{-1}$ e concentração inibitória mínima (MIC) de 12,3 $\mu\text{L.L}^{-1}$, enquanto carvacrol foi o melhor inibidor do crescimento micelial com ED₅₀ igual a 2 e ED₉₅ igual a 3,4 $\mu\text{L.L}^{-1}$ e MIC de 6,1 $\mu\text{L.L}^{-1}$. Como biofumigantes em pós-colheita, o *trans*-2-hexenal a 10 $\mu\text{L.L}^{-1}$ demonstrou o melhor controle da podridão parda em damasco (68,5%) e a 20 $\mu\text{L.L}^{-1}$ em pêssego, nectarina e ameixa, com eficiência variando de 46,2% a 80,3%, dependendo da cultivar. Observaram, ainda, o controle com citral e carvacrol a 50 $\mu\text{L.L}^{-1}$, em nectarinas, porém, de maneira menos eficiente, resultando em 40% e 32,9% de controle. A fumigação com *trans*-2-hexenal a 10 e 20 $\mu\text{L.L}^{-1}$ causou, em ameixa, a 20 $\mu\text{L.L}^{-1}$, em todas as cultivares de damasco, pêssego e nectarina e a 10 $\mu\text{L.L}^{-1}$ em algumas cultivares de damasco, pêssego e nectarina. Odores, aroma fermentado ou sabores foram percebidos em todas as espécies de frutas de caroço testadas nas doses aplicadas acima de 5 $\mu\text{L.L}^{-1}$.

Dentre os produtos voláteis que caracterizam o aroma de morango, o *trans*-hex-2-enal, que se apresentou como o melhor inibidor do crescimento micelial e da germinação de *Colletotrichum acutatum* nas doses inibitórias mínimas de 33,65 $\mu\text{L.L}^{-1}$ e 6,76 $\mu\text{L.L}^{-1}$, respectivamente, *in vitro*, também inibiu o crescimento desse patógeno nos frutos inoculados, impedindo o aparecimento dos sintomas (ARROYO et al., 2007)

No controle da antracnose em pós-colheita de frutos de manga (Nam Dokmai), Duamkhanmanee (2008) observou a eficiência do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* Stapf.) na concentração de 4.000 ppm em

água quente, antes e após a inoculação, com suspensão de conídios de *Colletotrichum gloeosporioides*, com notas médias mínimas de 2,40 e 1,85, respectivamente, enquanto as notas médias dos tratamentos de carbendazim a 100 ppm em água quente foram de 2,60 e 1,95, respectivamente.

Tripathi, Dubey e Shukla (2008) verificaram a atividade antifúngica dos óleos essenciais de *Chenopodium ambrosioides*, *Eucalyptus citriodora*, *Eupatorium cannabinum*, *Lawsonia inermis*, *Ocimum canum*, *O. gratissimum*, *O. sanctum*, *Prunus persica*, *Zingiber cassumunar* e *Z. officinale* pela inibição total do crescimento micelial de *Botrytis cinerea*, agente etiológico da podridão cinzenta da uva. A aplicabilidade prática dos óleos essenciais de *O. sanctum*, *P. persica* e *Z. officinale*, no controle da podridão cinzenta da uva, foi comprovada pelo aumento de vida de armazenamento em até 5, 4 e 6 dias. Os mesmos não apresentaram nenhum efeito fitotóxico sobre a casca da fruta, podendo ser recomendados como potenciais fungicidas botânicos ecologicamente corretos (*ecofriendly*).

Barrera-Necha et al. (2008) verificaram a eficiência dos óleos de *Cinnamomum zeylanicum* e *Syzygium aromaticum* a 50, 100, 150, 200 e 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, sobre a germinação de conídios de *Colletotrichum gloeosporioides* isolado de mamão (*Carica papaya* L.), com inibição superior a 98%. O crescimento micelial foi totalmente inibido por *Thymus vulgaris* a partir de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e *Cinnamomum zeylanicum* e *Syzygium aromaticum* apresentaram efeito dose dependente. Os óleos de *Ambrosioides Teloxys*, *Mentha piperita* e *Ruta chalepensis* apresentaram ação moderada a 150, 200 e 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ sobre a germinação de conídios e inibição do crescimento micelial. *Allium sativum*, *Citrus aurantifolia* e *Eucalyptus globulus* não demonstraram atividade antifúngica nas diferentes concentrações. Após o armazenamento a 28°C, durante 5 dias, observaram que os frutos de mamoeiro tratados com *C. zeylanicum* a 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e *S. aromaticum* a 50 e 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ apresentavam

menor percentual de infecção, diferindo estatisticamente do controle. A 14°C, após 8 dias, *C. zeylanicum* e *S. aromaticum* a 50 e 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ também diferiram estatisticamente do controle e *C. zeylanicum* a 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e *S. aromaticum* a 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ apresentaram-se estatisticamente iguais ao fungicida. Após o armazenamento em ambas as temperaturas, os valores de peso, firmeza e sólidos solúveis não diferiram estatisticamente. Os resultados indicaram a possibilidade do uso de *C. zeylanicum* e *S. aromaticum* para o controle de *C. gloeosporioides* em mamão.

Amiri et al. (2008) verificaram que o crescimento micelial de *Phlyctema vagabunda*, *Penicillium expansum*, *Botrytis cinerea* e *Monilinia fructigena*, importantes patógenos em pós-colheita de frutos de maçã, foi completamente inibido na presença do volátil eugenol a 150 $\mu\text{l.L}^{-1}$, a 4°C ou a 20°C. A mistura de eugenol a 2 mg.mL^{-1} e lecitina de soja a 50 mg.mL^{-1} suprimiu os sintomas de fitotoxidez produzidos por eugenol sobre as maçãs e reduziram a incidência da doença de *P. expansum*, *P. vagabunda*, *B. cinerea* e *M. fructigena* para valores inferiores a 7%, 6%, 4% e 2%, respectivamente, após 6 meses de armazenamento a 2°C.

Sukatta et al. (2008), pelo método da placa de Petri invertida, verificaram a atividade antifúngica dos óleos de cravo e canela contra *Aspergillus niger*, *Alternaria alternata*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Phomopsis viticola* e *Rhizopus stolonifer*, patógenos pós-colheita que causam a deterioração das uvas, apresentando concentrações inibitórias mínimas de 200, 200, 400, 800, 200 e 200 mg.mL^{-1} e 50, 100, 200, 200, 100 e 800 mg.mL^{-1} , respectivamente. Em relação ao efeito sinérgico dos óleos de cravo e canela, as proporções 3:7, 2:8 e 1:9 demonstraram ser eficientes na inibição de todos os patógenos, com MIC de 400 mg.mL^{-1} .

Rozwalka et al. (2008) observaram inibição total do crescimento micelial de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides* isolados de

frutos de goiabeiras, na presença dos vapores do óleo essencial de cravo-da-índia. O óleo de capim-limão (*Cymbopogon citratus*) apresentou ação fungitóxica sobre *C. loeosporioides* e, sobre *G. ingulata*, ação fungistática até o quinto dia. Verificaram a formação de halos de inibição quando ocorreu o contato de *G. ingulata* com os óleos essenciais de camomila (*Chamomila recutita*), gengibre (*Zingiber officinale*) e folhas de goiabeira (*Psidium guajava*) e de *C. loeosporioides* com camomila, goiaba e tagetes (*Tagetes minuta*), provavelmente devido à presença de compostos fixos com ação fungitóxica.

Tripathi e Shukla (2009) comprovaram a atividade antifúngica dos óleos essenciais de gerânio, hortelã, palmarosa, óleos e tomilho, pela inibição total de *Botryodiplodia theobromae*, agente etiológico da podridão peduncular de frutos de manga. Verificaram a maior eficiência dos óleos de gerânio (200 ppm), hortelã (100 ppm), palmarosa (100 ppm) e tomilho (50 ppm) em relação aos fungicidas mediante comparação dos valores de concentração inibitória mínima (MIC). A aplicabilidade prática dos óleos essenciais de gerânio, hortelã, tomilho e palmarosa como fumigantes foi observada no controle da podridão peduncular de frutos de manga, pelo aumento da vida útil de armazenamento em 5 dias, para a variedade Dasher e, em 10 dias, para a variedade Langra.

Tzortzakis (2009) observou redução no desenvolvimento das colônias de *Colletotrichum coccodes*, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium herbarum*, *Rhizopus stolonifer* e *Aspergillus niger*, na presença do vapor do óleo essencial de canela (*Cinnamomum zeylanicum* L.), entre 25 e 500 ppm, *in vitro*. Em comparação ao controle, a esporulação foi inibida até 63% a 25 ppm e completamente inibida a 500 ppm, exceto para *B. cinerea*. A germinação dos esporos e o comprimento dos tubos germinativos *Colletotrichum coccodes*, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium herbarum* e *Rhizopus stolonifer* apresentaram-se reduzidos, com efeito dose dependente, exceto para *A. niger*, em que o óleo de canela a 100 ppm desencadeou o aumento da germinação dos esporos. Em pimentas inoculadas

por fermentos, foi observado o desenvolvimento acelerado de *B. cinerea* e *C. coccodes*, no terceiro dia após a exposição ao vapor de canela. A pré-exposição de tomate ao vapor de canela a 500 ppm, durante 3 dias e, em seguida, inoculados, reduziu o desenvolvimento de lesões de *B. cinerea* e *C. coccodes*.

Souza Júnior, Sales e Martins (2009), avaliando o efeito fungitóxico de óleos essenciais sobre *Colletotrichum gloeosporioides* isolado do maracujazeiro-amarelo, verificaram que os óleos essenciais de *Lippia sidoides*, *Ocimum gratissimum*, *Lippia citriodora*, *Cymbopogon citratus* e *Psidium guayava* var. *pomifera*, incorporados em meio ágar-água e BDA (batata, dextrose e ágar), a partir da concentração de $1 \mu\text{L.mL}^{-1}$, inibiram totalmente a germinação dos conídios. Observaram a inibição total do crescimento micelial pelos óleos de *Lippia sidoides*, *Ocimum gratissimum*, *Lippia citriodora* e *Cymbopogon citratus*. O óleo da *Psidium guayava* var. *pomifera* mostrou inibição crescente sobre o micélio do *C. gloeosporioides* com o aumento das concentrações (1, 3, 5 e $10 \mu\text{L.mL}^{-1}$).

Anaruma et al. (2010) determinaram a atividade de 28 óleos essenciais, constatando atividade de 15 deles contra *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc., agente da antracnose em maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg). *In vitro*, os óleos de *Coriandrum sativum* ($0,25 \text{ mg.mL}^{-1}$), *Cymbopogon citratus* ($0,25 \text{ mg.mL}^{-1}$), *Cymbopogon flexuosus* ($0,25 \text{ mg.mL}^{-1}$) e *Lippia alba* ($0,3 \text{ mg.mL}^{-1}$) apresentaram os menores valores de concentrações inibitórias mínimas (MIC). O índice de doença das amostras tratadas com o óleo essencial de *Cymbopogon citratus* não diferiu do índice das amostras tratadas com fungicidas, demonstrando potencial para o controle do agente da antracnose em maracujá-amarelo.

Corato et al. (2010), avaliando a atividade antifúngica do óleo de *Laurus nobilis* (louro), verificaram inibição total do crescimento micelial de *Monilinia laxa* a 200 mg.mL^{-1} e de *Botrytis cinerea* a 1.000 mg.L^{-1} e ação fungistática em

ambos os casos. *Penicillium digitatum* foi parcialmente inibido nas concentrações 200, 400, 600, 800 e 1.000 mg.L⁻¹. Verificaram a atividade de protecção em kiwi e em pêssego, que apresentaram 68% e 91% de inibição de lesões *B. cinerea* e *M. laxa*, respectivamente, quando o óleo de louro a 3 mg.mL⁻¹ foi aplicado por pulverização antes da inoculação dos patógenos. Em pêssego, o efeito curativo foi verificado pela redução de 76% de inibição de lesões de *M. laxa*, quando o óleo foi colocado após a infecção. Não observaram qualquer efeito fitotóxico ou alterações de sabor e aroma nos frutos tratados. Por cromatografia gasosa, no óleo de louro foram identificadas, como principais substâncias ativas com teores $\geq 10\%$, 1,8-cineol, linalol, acetato de terpineol, eugenol methyl e com teores $< 10\%$ linalyl acetato, eugenol, sabineno, β -pineno e α -terpineol.

A determinação da atividade biológica dos metabólitos secundários das plantas medicinais com respeito à atividade antimicrobiana direta ou ativando mecanismos de defesa das plantas tratadas, bem como o fracionamento e a identificação desses metabólitos poderão contribuir para a aquisição de maiores conhecimentos que reforcem sua possível utilização como um método alternativo de controle de doença de plantas (STANGARLIN, et al., 1999). Entretanto, ainda é reduzido o número de trabalhos que demonstram a atividade biológica e o modo de ação desses compostos secundários sobre fitopatógenos em pós-colheita, sendo de fundamental importância o desenvolvimento de mais pesquisas para atender aos requisitos de sustentabilidade.

2.5 Películas biodegradáveis

As embalagens produzidas com polímeros sintéticos convencionais, inertes ao ataque imediato de microrganismos, após descarte, demoram, em média, 100 anos para a decomposição total, ocasionando sérios problemas

ambientais (ROSA; FRANCO; CALIL, 2001).

Devido às questões ambientais relacionadas com a eliminação de embalagens sintéticas convencionais, demanda crescente de uma variedade de alimentos frescos, necessidade de produtos alimentares com vida útil prolongada, expansão de canais de distribuição para comodities e novas oportunidades para produtos alimentares com barreiras comestíveis, nas últimas décadas, tem ocorrido um interesse crescente no desenvolvimento e no uso de embalagens biodegradáveis para prolongar a vida útil e melhorar a qualidade de produtos frescos (DIAB et al., 2001).

Além das funções idênticas aos filmes sintéticos, os filmes e os revestimentos/coberturas comestíveis também devem atender a requisitos adicionais relativos à sua utilização em alimentos, tais como possuir características sensoriais aceitáveis, boa resistência mecânica e aderência, estabilidade microbiana, bioquímica e físicoquímica razoáveis; apresentar-se como uma barreira adequada para gases, água e óleo, livre de microrganismos tóxicos e compostos perigosos; ser eficiente no transporte de antioxidantes, aroma, cor, aditivos antimicrobianos ou nutricionais; serem produzidos a partir de matérias-primas de baixo custo mediante tecnologia simples (DEBEAUFORT; QUEZADA-GALLO; VOILLEY, 1998).

Para atender às necessidades de mercado, estão sendo desenvolvidas as chamadas embalagens ativas que, frente às mudanças no ambiente ao redor do produto, respondem com alterações em suas propriedades (SARANTÓPOULOS; FERNANDES, 1996). Embalagens ativas para frutas e hortaliças *in natura* devem absorver etileno (fito-hormônio associado ao amadurecimento) e liberar substâncias fungicidas ou fungistáticas, reduzindo tanto a atividade fisiológica quanto do desenvolvimento microbiológico (VILAS BOAS; CHITARRA; RESENDE, 2001). A utilização de coberturas de superfície pode exercer efeito semelhante à estocagem sob atmosfera controlada

(KADER, 1995). O uso de películas com esse propósito para revestimento de frutas e hortaliças frescas, visando minimizar a perda de umidade e reduzir as taxas de respiração, além de conferir aparência brilhante e atraente, constitui vantagem econômica, evitando a necessidade de estocagem em atmosfera controlada que implicaria em custos operacionais e de equipamento (KESTER; FENNEMA, 1986).

Ceras (óleo mineral, parafina, carnaúba, candelila, cera de abelha, polietileno, goma-laca) têm sido utilizadas amplamente como revestimentos nos frutos, como laranjas, limões, toranjas, maçãs, peras, cerejas, bananas, goiabas, mangas, lichias, tâmara, coco, pêssego, uvas, melões e alguns vegetais (OLIVEIRA; CEREDA, 1999).

Para a produção de biofilmes são utilizados biopolímeros, como amido, pectina, celulose e seus derivados, colágeno, gelatina e proteínas miofibrilares. Dependendo da matéria-prima utilizada, o filme pode ser classificado como biodegradável ou comestível (CARVALHO; SOBRAL; MENEGALLI, 1997).

Atualmente, existe um interesse considerável na utilização de filmes e coberturas essencialmente compostos por amido. No cenário dos recursos renováveis, o amido é encontrado em abundância na natureza, tem caráter renovável e custo relativamente baixo, sendo, portanto, grande fonte de exploração econômica (RÓZ et al., 2001).

O amido geleificado tem a propriedade de formar géis que, desidratados, dão origem a películas rígidas e transparentes. A obtenção de películas de amido baseia-se no princípio de geleificação da fécula (altas temperaturas, com excesso de água), com posterior retrodegradação. Na retrodegradação, pontes de hidrogênio são estabelecidas e o material disperso se reorganiza em macromolécula, originando uma película protetora em volta do fruto. A fécula geleificada, quando desidratada, devido às suas propriedades físicoquímicas, pode formar películas semelhantes às de celulose em resistência e transparência,

representando, na conservação de frutas e hortaliças, uma alternativa potencial. Não sendo tóxica, pode ser ingerida juntamente com frutos e hortaliças, sendo facilmente removida quando necessário. Além disso, a partir de mandioca, apresenta-se como produto comercial de custo baixo, US\$0,20 a US\$0,30 o kg de fécula, quando comparado às ceras comerciais, ao custo de US\$7,00 o litro. Biofilmes feitos de amido passaram a ser mais intensivamente estudados quando o amido de mandioca foi selecionado como uma matéria-prima mais adequada (CEREDA; BERTOLINI; EVANGELISTA, 1992).

O uso de biofilmes de fécula de mandioca, na conservação pós-colheita de morango, armazenados em condição ambiente (21°C; 64,5% UR), propiciou diminuição da perda de peso, aumento da textura, retenção de coloração, prolongando em até cinco vezes a vida pós-colheita, não sendo detectados sabor e aroma estranhos (HENRIQUE; CEREDA, 1999).

Oliveira e Cereda (1999) verificaram que a película de fécula de mandioca (1 e 2%) acarretou uma diminuição de perda de peso e da taxa respiratória dos frutos de goiabeira da variedade Kumagai em relação ao tratamento testemunha, porém, superiores ao tratamento com a cera de carnaúba star-fresh. Apesar disso, consideraram que a mesma tem futuro promissor na substituição de ceras comerciais, por ser um produto natural e visto que proporcionou aumento na vida de prateleira dos frutos em comparação ao tratamento testemunha, sendo necessários ajustes e estudos de formulações das películas, no intuito de reduzir ainda mais estes valores.

A aplicação das películas de fécula de mandioca, a 2% e a 3%, em frutos de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill), não influenciou significativamente a perda de massa e a textura, após 22 dias de armazenamento. Entretanto, os frutos recobertos com película a 3% apresentaram melhor aparência em relação aos frutos da testemunha e recobertos com película a 2% (DAMASCENO et al., 2003).

Na conservação pós-colheita de acerola, Maciel et al. (2004) observaram que o uso de biofilme de mandioca a 1% conservou o maior teor de ácido ascórbico e a temperatura de 10°C estendeu a vida útil dos frutos recobertos com biofilme a 1% e a 2%, mantendo características de qualidade, sólidos solúveis totais, pH, acidez total titulável aceitáveis por um período de até 15 dias.

A aplicação de película de fécula de mandioca a 4% proporcionou ao pepino japonês (*Cucumis sativus* L.) um aspecto melhor de conservação, tornando-o mais atraente. Sob refrigeração a 5°C, a película reduziu significativamente a perda de massa das amostras (REIS et al., 2006).

Os revestimentos comestíveis à base de fécula de mandioca a 1% e a 3%, em temperatura ambiente, retardaram o amadurecimento dos frutos de mamão 'Formosa Tainung 1', apresentando alterações de cor da casca, firmeza da polpa, sólidos solúveis totais e acidez total titulável significativamente mais lentas que os frutos não tratados, prolongando a vida útil pós-colheita por quatro dias, sem afetar a qualidade dos mesmos (PEREIRA et al., 2006).

O uso de filmes e coberturas biodegradáveis à base de fécula de mandioca tem sido, até o momento, pouco documentado. A utilização de películas comestíveis como obstáculo ao crescimento microbiano foi mencionada por Leistner e Gorris (1995). Porém, observa-se que ênfase é dada para a conservação das características físico-químicas de frutas e hortaliças durante o processo de maturação, permanecendo a inibição do crescimento microbiano inculcida nos resultados, mas não claramente elucidada.

Diante do exposto, pode-se inferir que filmes e coberturas biodegradáveis à base de fécula de mandioca constituem numa nova estratégia para o controle de doenças pós-colheita.

2.6 A microscopia eletrônica na elucidação da interação patógeno-

hospedeiro (histopatologia) e do modo de ação de produtos em patógenos

Para a elucidação da interação patógeno-hospedeiro que ocorre em âmbito celular, a microscopia eletrônica de varredura (MEV) e a microscopia eletrônica de transmissão (MET) apresentam-se como importantes ferramentas, pois permitem a visualização dos eventos de infecção (pré-penetração: adesão, germinação, em alguns casos, formação de apressórios, penetração e estabelecimento das relações parasitárias), colonização e reprodução, bem como as reações das plantas aos patógenos.

As microscopias eletrônicas de varredura e transmissão podem fornecer também informações relevantes sobre o modo de ação de produtos sobre a morfologia de patógenos. Assim, enquanto estudos bioquímicos e/ou moleculares identificam as vias metabólicas onde o produto age, MET e MEV revelam as alterações ultraestruturais estruturais, respectivamente.

A ultraestrutura de fungos e a interação patógeno-hospedeiro está bem documentada na literatura, ao contrário do modo de ação de produtos sobre patógenos, que tem número reduzido de trabalhos já publicados. Buckley, Sjaholm e Sommer (1966), por meio de microscopia eletrônica de transmissão, comparam a ultraestrutura de conídios germinados e não germinados de *Botrytis cinerea*, verificando que a utilização do material armazenado resultou em intensa vacuolização em conídios com germinação avançada.

Maeda (1970) observou, durante processo de penetração de *Venturia inaequalis* em maçã, aumento da eletrodensidade na cutícula junto aos locais de penetração pela degradação da cutícula. Chau e Alvarez (1983) observaram ausência de danos mecânicos e aparecimento de região eletrodensa, sugerindo a dissolução da parede celular de mamão próxima ao peg de infecção, via enzimas produzidas por *Colletotrichum gloeosporioides*.

Os processos de penetração e colonização de *Colletotrichum musae* em bananas maduras e verdes foram observados por Chang, Lin e Leu (1987) e

Chang, Routree e Leu (2000), respectivamente, por meio de microscopia eletrônica de varredura e de transmissão. Ferreira et al. (2009), avaliando os eventos do processo de infecção de *Colletotrichum gloeosporioides* isolado de folhas de cafeeiro e mangueira inoculados em folhas de *Coffea arabica* L., por meio de microscopia eletrônica de varredura, observaram conídios de todos os isolados aderidos frequentemente nas depressões das células da epiderme e células-guarda dos estômatos com septos formados antes da germinação. Verificaram, ainda, a germinação dos isolados de cafeeiro em folhas entre 6 e 8 horas e a formação de apressórios 12 e acérvulos entre 96 e 144, após a inoculação. No isolado de mangueira, após a inoculação, observaram a germinação entre 6 e 8 horas, com formação de apressório de 8 a 12 horas e produção de novos conídios diretamente em hifas conidiogênicas, não sendo observada a formação acérvulos para este isolado.

Por meio da microscopia eletrônica de varredura, Zambonelli et al. (1996) observaram a degeneração de hifas e o extravasamento celular de *Colletotrichum lindemuthianum* e *Pythium ultimum* pelo óleo de tomilho a 800 ppm, que promoveu a redução do crescimento micelial, *in vitro*.

Após observarem a inibição parcial de *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., *Rhizoctonia solani* Kühn e *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. e Magnus) e Briosi Cav e total de *Pythium ultimum* Trow var. *ultimum* na concentração máxima (100 mL.L⁻¹) do extrato aquoso de *Allium sativum* (alho), Bianchi et al. (1997) realizaram estudo ultraestrutural para elucidar o modo de ação e os efeitos de *Allium sativum* sobre fungos fitopatogênicos, *in vitro*. Por meio de microscopia eletrônica de varredura e transmissão, verificaram colapso das hifas de *Rhizoctonia solani* e *Colletotrichum lindemuthianum*. As hifas de *Fusarium solani*, embora menos danificadas, apresentavam-se mais finas que as hifas do controle. Um aumento geral da vacuolização também foi observado, com conseqüente redução no citoplasma das células fúngicas tratadas. Em

Rhizoctonia solani, também foi observado um espessamento da parede celular e, em *Colletotrichum lindemuthianum*, um acúmulo de corpos osmofílicos sob a membrana celular.

Rasooli, Rezaei e Allameh (2006), por meio de microscopia eletrônica de transmissão (MET), observaram colapsamento severo de hifas, ruptura de membrana plasmática e destruição das mitocôndrias em *Aspergillus niger* tratado com os óleos essenciais de *Thymus eriocalyx* e *Thymus x-porlock*. Observaram, ainda, danos irreversíveis a paredes, membranas e organelas celulares, pela exposição dos esporos do patógeno aos óleos *Thymus eriocalyx* e *Thymus x-porlock*, nas concentrações inibitórias mínimas de 125 e 250 ppm, respectivamente.

Soylu, Soyly e Kurt (2006), por meio de microscopia eletrônica de varredura e microscopia de luz, verificaram alterações morfológicas das hifas de *Phytophthora infestans* expostas às fases voláteis e de contato do óleo de orégano (*Origanum syriacum* var. *bevanii*), como coagulação citoplasmática, vacuolização, enrugamento das hifas e extravasamento do protoplasto. Sharma e Tripathi (2006), por meio de microscopia eletrônica de varredura, observaram, além de distorção, afinamento da parede e redução do diâmetro das hifas, a ausência de conidióforos em *Aspergillus niger* promovida pelo óleo essencial *Citrus sinensis*.

Após comprovação da eficiência do composto volátil *trans*-hex-2-enal sobre crescimento micelial e germinação de *Colletotrichum acutatum*, um dos agentes causadores de antracnose em morangos, *in vivo* e *in vitro*, Arroyo et al. (2007), por meio de microscopia eletrônica de transmissão, verificaram que o mesmo causou alterações nas estruturas da parede celular e membrana plasmática, com conseqüente desorganização e destruição de organelas e, eventualmente, a morte celular.

Observações em microscopia eletrônica de transmissão e de luz

revelaram alterações morfológicas consideráveis nas hifas e escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*, causadas pelos óleos essenciais de orégano (*Origanum syriacum* var. *bevanii*) e funcho (*Foeniculum vulgare*), que demonstraram eficiência inibindo significativamente o crescimento de *S. sclerotiorum* no solo tratado, aumentando, assim, o número de mudas de tomate sobreviventes para 69,8% e 53,3%, respectivamente (SOYLU et al., 2007).

A aplicação das microscopias eletrônicas de transmissão e varredura na elucidação da interação patógeno-hospedeiro e do modo de ação de óleos essenciais quimicamente complexos sobre os patógenos em nível celular poderá subsidiar/auxiliar sobremaneira na determinação de estratégias de controle de doenças em plantas.

REFERÊNCIAS

- ADSULE, R. N.; KADAM, S. S. Guava. In: SALUNKHE, D. K.; KADAM, S. S. **Handbook of fruit science and technology: production, composition, storage and processing**. New York: Marcel Dekker, 1995. Cap. 9, p. 419-433.
- ALMEIDA, J. G. F. Barreira às exportações de frutas tropicais. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 7-10, 2002. Suplemento.
- ALZAMORA, S. M. et al. Application of combined methods technology in minimally processed fruits. **Food Research International**, London, v. 26, n. 2, p. 125-130, 1993.
- AMIRI, A. et al. *In vitro* and *in vitro* activity of eugenol oil (*Eugenia caryophyllata*) against four important postharvest apple pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 12, n. 1, p. 13-19, Jan. 2008.
- AMORIM, L. Infecção. In: AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. Cap. 15, p. 295-308.
- AMORIM, L.; MARTINS, C. M. Controle químico. In: OLIVEIRA, S. M. A. et al. (Ed.). **Patologia pós-colheita: frutas, olerícolas e ornamentais tropicais**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2006. Cap. 8, p. 227-243.
- ANARUMA, N. D. et al. Control of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. in yellow passion fruit using *Cymbopogon citratus* essential oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 41, n. 1, p. 66-73, Jan./Mar. 2010.
- ANDRIGUETO, J. G.; KOSOSKI, A. R. **Marco legal da produção integrada de frutas do Brasil**. Brasília: MAPA/SARC, 2002. 60 p.
- ANDRIGUETO, J. R.; NASSER, L. C. B.; TEIXEIRA, J. M. A. **Produção integrada de frutas: conceito, histórico e a evolução para o sistema agropecuário de produção integrada - SAPI**. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2006. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 20 mar. 2010.
- ARROYO, F. T. et al. Antifungal activity of strawberry fruit volatile compounds against *Colletotrichum acutatum*. **Journal of Agricultural Food and Chemistry**, Easton, v. 55, n. 14, p. 5701-5707, July 2007.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE HORTICULTURA. **Sistema de Informações de Resíduos de Agrotóxicos em Horticultura**. Disponível em: <www.abhorticultura.com.br>. Acesso em: 20 mar. 2007.

AZEVEDO, L. A. S. **Fungicidas sistêmicos: teoria e prática**. São Paulo: EMOPI, 2007. 284 p.

AZIZI, M. et al. Inhibitory effect of some medicinal plants' essential oils on postharvest fungal disease of citrus fruits. In: INTERNATIONAL HORTICULTURAL CONGRESS, 27., Belgium. **Anais...** Belgium: Acta Horticulturae, 2008. p. 279-286.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils - A review. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 2, p. 446-475, Feb. 2008.

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**, Oxford, v. 7, n. 2, p. 174-178, Mar. 2008.

BASSETTO, E.; JACOMINO, A. P.; PINHEIRO, L. Conservation of 'Pedro Sato' guavas under treatment with 1-methylcyclopropene. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 5, p. 433-440, maio 2005.

BETTIOL, W.; GHINI, R. Controle biológico. In: AMORIM, BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. Cap. 36, p. 717-727.

BETTIOL, W.; GHINI, R. Métodos alternativos usados com sucesso no Brasil para o controle de doenças de plantas. In: STADNICK, M. J.; TALAMINI, V. (Ed.). **Manejo ecológico de doenças de plantas**. Florianópolis: CCA/UFSC, 2004. p. 143-157.

BIANCHI, A. et al. Ultrastructural studies of the effects of *Allium sativum* on phytopathogenic fungi *in vitro*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 81. n. 11, p. 1241-1246, Nov. 1997.

BRASIL é o terceiro maior produtor mundial de frutas. Brasil Alimentos, São Paulo, ago. 2009. Disponível em: <<http://www.brasilalimentos.com.br/neg%C3%B3cios/2009/brasil-%C3%A9-o-terceiro-maior-produtor-mundial-de-frutas>>. Acesso em: 24 fev. 2010.

BROWN, B. I.; WILLS, R. B. H. Post-harvest changes in guava fruit of different maturing. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 19, n. 3/4, p. 237-243, Apr. 1983.

BUAINAIN, A. M.; BATALHA, M. O. **Cadeia produtiva de frutas**. Brasília: IICA/ MAPA/SPA, 2007. 102 p.

BUCKLEY, P. M.; SJAHOLM, V. E.; SOMMER, N. F. Electron Microscopy of *Botrytis cinerea* conidia. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 91, n. 5, p. 2037-2044, May 1966.

CARVALHO, R. A.; SOBRAL, P. J. A.; MENEGALLI, F. C. Elaboração de biofilmes a base de gelatina. In: CONGRESSO DE BIOPOLÍMEROS, 1997, Pirassununga. **Anais...** Pirassununga: Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, 1997. p. 94-97.

CARVALHO, V. D. de. Qualidade e conservação pós-colheita de goiabas. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 17, n. 179, p. 48-54, 1994.

CEREDA, M. P.; BERTOLINI, A. C.; EVANGELISTA, R. M. Uso do amido em substituição às ceras na elaboração de filmes na conservação pós-colheita de frutas e hortaliças: estabelecimento de curvas de secagem. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MANDIOCA, 7., 1992, Recife. **Anais...** Recife: [s.n.], 1992. p. 107.

CERQUEIRA, T. S. et al. Controle do amadurecimento de goiabas 'Kumagai' tratadas com 1-metilciclopropano. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 31, n. 3, p. 687-692, set. 2009.

CHANG, H. C.; ROUTREE, R. L.; LEU, L. S. Electron microscopic observation of unripe banana fruit infected with *Colletotrichum musae*. **Plant Protection Bulletin**, Taiwan, v. 42, n. 3, p. 135-146, Sept. 2000.

CHANG, C. W.; LIN, S. H.; LEU, L. S. Electron microscopy of penetration and colonization process of *colletotrichum musae* on ripe banana fruit. **Plant Protection Bulletin**, Taiwan, v. 29, n. 1, p. 71-75, Mar. 1987.

CHAU, K. F.; ALVAREZ, A. M. A. Histological study of antracnose on *Carica papaya*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 73, n. 3-4, p. 1113-1116, Dec. 1983.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio**. 2. ed. rev. e ampl. Lavras: UFLA, 2005. 785 p.

CHU, C. L.; LIU, W. T.; ZHOU, T. Fumigation of sweet cherries with timol and acetic acid to reduce postharvest brown rot and blue mold rot. **Fruits**, Paris, v. 56, n. 2, p. 123-130, Mar./Apr. 2001.

CORATO, U. de. et al. Use of essential oil of *Laurus nobilis* obtained by means of a supercritical carbon dioxide technique against post harvest spoilage fungi **Crop Protection**, Guildford, v. 29, n. 2, p. 142-147, Feb. 2010.

DAMASCENO, S. et al. Efeito da aplicação de película de fécula de mandioca na conservação pós-colheita de tomate. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 3, p. 377-380, set./dez. 2003.

DEBEAUFORT, F.; QUEZADA-GALLO, J. A.; VOILLEY, A. Edible films and coatings: tomorrow's packagings: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Cleveland, v. 38, n. 4, p. 299-313, Dec. 1998.

DHINGRA, O. D. Patologia pós-colheita. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 11, n. 122, p. 46-50, fev. 1985.

DIAB, T. et al. Physicochemical properties and application of pullulan edible films and coatings in fruit preservation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 81, n. 10, p. 988-1000, Nov. 2001.

DUAMKHAMANEE, R. Natural essential oils from lemon grass (*Cymbopogon citratus*) to control postharvest anthracnose of mango fruit. **International Journal of Biotechnology**, New York, v. 10, n. 1, p. 104-108, 2008.

ECKERT, J. W.; OGAWA, J. M. The chemical control of postharvest diseases: Subtropical and tropical fruits. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 23, p. 421-454, Dec. 1985.

EDRIS, A. E.; FARRAG, E. S. Antifungal activity of peppermint and sweet basil essential oils and their major aroma constituents on some plant pathogenic fungi from the vapor phase. **Nahrung: chemie, biochemie, mikrobiologie, technologie, ernahrung**, Berlin, v. 47, n. 2, p. 117-121, Apr. 2003.

FAKHOURI, F. M.; GROSSO, C. Efeito de Coberturas Comestíveis na vida útil de goiabas in natura (*Psidium guajava* L.) mantidas sob refrigeração **Revista Brasileira de Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 6, n. 2, p. 203-211, jul./dez. 2003.

FERREIRA, J. B. et al. Aspectos morfológicos da colonização de *Colletotrichum gloeosporioides* em órgãos de plantas de cafeeiros e com sintomas da mancha manteigosa. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 4, p. 956-964, maio/jun. 2009.

FRENCH, R. C. Volatile chemical germination stimulators of rust and other fungal spores. **Mycologia**, New York, v. 84, n. 3, p. 277-288, June 1992.

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

GONZAGA NETO, L. **Cultura da goiabeira**. Petrolina: EMBRAPA/CPATSA, 1990. 8 p. (Circular Técnica, 23).

GONZAGA NETO, L. **Estudos de métodos de produção e de enxertia da goiabeira (*Psidium guajava* L.)**. 1982. 51 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

GORGATTI NETTO, A. et al. **Goiaba para exportação: procedimentos de colheita e pós-colheita**. Brasília: EMBRAPA/SPI/FRUPEX, 1996. 35 p.

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

IBRAF consolida agronegócios internacionais. Brasil Agro, São Paulo, fev. 2010. Disponível em: <<http://www.brasilagro.com.br/index.php?pag=noticias.php?id=24964>>. Acesso em: 24 fev. 2010.

INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA. **Comparativo Exportacoes Brasileiras 2008-2007**. Disponível em: <[http://www.ibraf.org.br/estatisticas/Exportação/ComparativoExportacoes Brasileiras2008-2007.pdf](http://www.ibraf.org.br/estatisticas/Exportação/ComparativoExportacoes%20Brasileiras2008-2007.pdf)>. Acesso em: 30 jan. 2010.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/estadosat/temas.php?sigla=roetema=lavoura permanente2008>>. Acesso em: 30 jan. 2010.

JANSSEN, A. M. Antimicrobial activities of essential oils: a pharmacognostical study. In: SIANI, A. C. et al. Óleos essenciais: potencial anti-inflamatório. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 3, n. 16, p. 38-43, set./out. 2000.

JARVIS, W. R. Latent infections in pre and postharvest environment. **Hortscience**, Alexandria, v. 29, n. 7, p. 749-751, July 1994.

JUNQUEIRA, N. T. V. Doenças e pragas. In: MANICA, I. et al. **Goiaba**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2000. cap. 9, p. 225-247. (Fruticultura Tropical, 6).

KADER, A. A. Regulation of fruit physiology by controlled modified atmospheres. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 398, p. 59-67, 1995.

KESTER, J. J.; FENNEMA, O. R. Edible films and coatings: a review. **Food Technology**, Chicago, v. 40, n. 12, p. 47-59, Dec. 1986.

KIMATI, H. Controle químico. In: AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. Cap. 38, p. 761-785.

KIRK, P. M. et al. **Ainsworth e bisby's dictionary of the fungi**. 9. ed. Wallingford: CAB International, 2001. 655 p.

KOLLER, O. C. Cultura da goiabeira. Porto Alegre: Agropecuária, 1979. 44 p.

KULAKIOTU, E. K.; THANASSOULOPOULOS, C. C.; SFAKIOTAKIS, E. M. Postharvest biological control of *Botrytis cinerea* on kiwifruit by volatiles of 'Isabella' grapes. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 94, n. 12, p. 1280-1285, Dec. 2004.

LEE, S. O. et al. Antifungal activity of five plant essential oils as fumigant against postharvest and soilborne plant pathogenic fungi. **Plant Pathology**, Oxford, v. 23, n. 2, p. 97-102, June 2007.

LEISTNER, L. Food preservation by combined methods. **Food Research International**, London, v. 25, n. 2, p. 151-158, June 1992.

LEISTNER, L.; GORRIS, G. M. Food preservation by hurdle technology. **Trends in food science and technology**, Cambridge, v. 6, n. 2, p. 41-46, Feb. 1995.

- LIM, T. K.; MANICOM, B. Q. Diseases of guava. In: PLOETZ, R. C. (Ed.). **Diseases of tropical fruit crops**. Homestead: CABI, 2003. Chap. 12, p. 275-298.
- LINGK, W. Health risk evaluation of pesticides contaminating in drinking water. **Gesunde Pflanzen**, Berlin, v. 43, p. 21-25, 1991.
- LINHARES, L. A. et al. Transformações químicas, físicas e enzimáticas de goiabas Pedro Sato tratadas na pós-colheita com cloreto de cálcio E 1-metilciclopropeno e armazenadas sob refrigeração. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 3, p. 829-841, maio/jun. 2007.
- MACIEL, M. I. S. et al. Effects of biofilm and refrigeration on acerola postharvest conservation. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 26, n. 1, p. 168-170, abr. 2004.
- MAEDA, K. M. **An ultrastructural study of *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. Infection of *Malus* hosts**. 1970. 112 p. Thesis (Masters) - Purdue University, Lafayette.
- MAIA, M. L.; GARCIA, A. E. B.; LEITE, R. S. da S. F. Aspectos econômicos da produção e mercado. In: INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS. **Goiaba: cultura, matéria-prima, processamento e aspectos econômicos**. 2. ed. rev. ampl. Campinas, 1988. cap. 4, p. 177-224.
- MANICA, I. et al. **Goiaba**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2000. 374 p. (Fruticultura Tropical, 6).
- MELO, P. C. T. Da preocupação com a contaminação de frutas e hortaliças por resíduos de defensivos agrícolas, nasceu o SIRAH, sistema que permite monitorar a qualidade dos alimentos. **Revista Cultivar HF**, Pelotas, v. 7, n. 37, p. 31, abr./maio 2006.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. **TudoFácil**, Rio Grande do Sul, 2010. Disponível em: <<http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit>>. Acesso em: 2 fev. 2010.
- MORAES, M. V. P. de. Apresentação. In: ANDRIGUETO, J. R. **Marco legal da produção integrada de frutas do Brasil**. Brasília: MAPA/SARC, 2002.

NAKA, J. Produção integrada da fruticultura. **Agroverde Informe**, Bahia, 2001. Disponível em: <<http://www.ambiental.net/agroverde/Produc%20Integrada%20Frutas.htm>>. Acesso em: 20 jun. 2009.

NERI, F.; MARI, M.; BRIGATI, S. Control of *Penicillium expansum* by plant volatile compounds. **Plant Pathology**, Oxford, v. 55, n. 1, p. 100-105, Mar. 2006.

NERI, F. et al. Fungicidal activity of plant volatile compounds for controlling *Monilinia laxa* in stone fruit. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 91, n. 1, p. 30-35, Jan. 2007.

OCHSE, J. J. et al. Tropical and subtropical agriculture. In: GONZAGA NETO, L. **Cultura da goiabeira**. Petrolina: Embrapa, 1990. 26 p. (Circular Técnica, 23).

OLIVEIRA, M. A.; CEREDA, M. P. Efeito da película de mandioca na conservação de goiabas. **Revista Brasileira de Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 2, n. 1/2, p. 97-102, jan./jun. 1999.

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, nov./dez. 2006.

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, Mar. 2002.

PERFECT, S. E. et al. *Colletotrichum*: a model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 27, v. 2-3, p. 186-198, July 1999.

PLETSCH, M. Compostos naturais biologicamente ativos: a aplicação da biotecnologia à produção de compostos naturais biologicamente ativos. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 1, n. 4, p. 12-15, jan./fev. 1998.

PLOTTO, A.; ROBERTS, D. D.; ROBERTS, R. G. Evaluation of plant essential oils as natural postharvest disease control of tomato (*Lycopersicon esculentum*). **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 628, p. 737-745, 2003.

POSER, G. L. von; MENTZ, L. A. Diversidade biológica e sistemas de classificação. In: SIMÕES, C. M. de O. et al. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2. ed. Porto: Editora da UFRGS, 2000. cap. 4, p. 75-89.

RANASINGHE, L.; JAYAWARDENA, B.; ABEYWICKRAMA, K. An integrated strategy to control post-harvest decay of Embul banana by combining essential oils with modified atmosphere packaging. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 40, n. 1, p. 97-103, Jan. 2005.

RANASINGHE, L.; JAYAWARDENA, B.; ABEYWICKRAMA, K. Fungicidal activity of essential oils of *Cinnamomum zeylanicum* (L.) and *Syzygium aromaticum* (L.) Merr et L.M.Perry against crown rot and anthracnose pathogens isolated from banana. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 35, n. 3, p. 208-211, Mar. 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**, Guildford, v. 17, n. 5, p. 359-364, May 2006.

REDDY, M. V. B. et al. Characterization and use of essential oil from *Thymus vulgaris* against *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer* in strawberry fruits. **Phytochemistry**, Saint Paul, v. 47, n. 8, p. 1515-1520, Apr. 1998.

REIMANN, S; DEISING, H.B. Fungicides: Risk of resistance development and search for new targets. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, New York, v. 33, n. 4, p. 329-349, Nov. 2000.

REIS, K. C. dos. et al. Pepino japonês (*Cucumis sativus* L.) submetido ao tratamento com fécula de mandioca. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 3, p. 487-493, maio/jun. 2006.

ROSA, D. S.; FRANCO, B. L. M.; CALIL, M. R. Biodegradabilidade e propriedades Mecânicas de novas misturas poliméricas. **Polímeros: ciência e tecnologia**, São Paulo, v. 11, n. 2, p. 82-88, jun. 2001.

RÓZ, A. L. da. et al. Comportamento térmico e de absorção de umidade de amidos plastificados com glicóis. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE POLÍMEROS, 6., 2001, Gramado. **Anais...** Gramado: [s.n.], 2001. CD-ROM.

ROZWALKA, L. C. Extratos, decoctos e óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas na inibição de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides* de frutos de goiaba. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 2, p. 31-36, mar./abr. 2008.

RUEHLE, G. D. El cultivo de la guayaba em la Flórida. **Journal of Tropical Agriculture**, Ibaraki, v. 20, n. 10, p. 555-564, Nov. 1964.

SALUNKHE, D. K.; KADAM, S. S. **Handbook of fruit science and technology: production, composition, storage and processing**. New York: Marcel Dekker, 1995. Cap. 9, p. 419-433.

SARANTÓPOULOS, C. I. G. L.; FERNANDES, T. Embalagens ativas: uma nova geração de embalagens para frutas e hortaliças. **Boletim Técnico do Centro de Tecnologia de Embalagens**, Campinas, v. 13, n. 3, p. 4-6, jul./set. 2001.

SHAHI, S. K. et al. Use of essential oil as botanical-pesticide against post harvest spoilage in *Malus pumilo* fruit. **BioControl**, Dordrecht, v. 48, n. 2, p. 223-232, Apr. 2003.

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, June 2006.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. de O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2000. cap. 18, p. 467-495.

SINGH, G. et al. **Sugar Technology Reviews**, Amsterdam, v. 4, n. 1/2, p. 69-71, June 2002.

SOUBIHE SOBRINHO, J. **Estudos básicos para o melhoramento da goiabeira (*Psidium guajava* L.)**. 1951. 166 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba.

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

SOYLU, E. M.; SOYLU, S.; KURT, S. Antimicrobial activities of the essential oils of various plants against tomato late blight disease agent *Phytophthora infestans*. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 161, n. 2, p. 119-128, Feb. 2006.

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, Oct. 2007.

STANGARLIN, J. R. et al. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 2, n. 11, p. 16-21, nov./dez. 1999.

SUKATTA, U. et al. Antifungal activity of clove and cinnamon oil and their synergistic against postharvest decay fungi of grape *in vitro*. **Natural Science**, Copenhagen, v. 42, n. 5, p. 169-174, 2008.

TRIPATHI, P.; DUBEY, N. K. Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 32, n. 3, p. 235-245, June 2004.

TRIPATHI, P.; DUBEY, N. K. Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 32, n. 3, p. 235-245, June 2004.

TRIPATHI, P. et al. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 20, n. 3, p. 317-321, Apr. 2004.

TRIPATHI, P.; DUBEY, N. K.; SHUKLA, A. K. Use of some essential oils as post-harvest botanical fungicides in the management of grey mould of grapes caused by *Botrytis cinerea*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 24, n. 1, p. 39-46, Jan. 2008.

TRIPATHI, P.; SHUKLA, A. K. Application of essential oils for postharvest control of stem end rot of mango fruits during storage. **International Journal of Postharvest Technology and Innovation**, Oxford, v. 1, n. 4, p. 405-415, 2009.

TUCKER, G. A. Introduction. In: SEYMOUR, G. B.; TAYLOR, J. E.; TUCKER, G. A. **Biochemistry of fruit ripening**. London: Chapman e Hall, 1993. chap. 1, p. 1-52.

TZORTZAKIS, N. G. Impact of cinnamon oil-enrichment on microbial spoilage of fresh produce. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Amsterdam, v. 10, n. 1, p. 97-102, Jan. 2009.

TZORTZAKIS, N. G. Maintaining postharvest quality of fresh produce with volatile compounds. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Amsterdam, v. 8, n. 1, p. 111-116, Mar. 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, June 2007.

UNNIKRISHNAN, V.; NATH, B. S. Hazardous chemicals in foods. **Indian Journal of Dairy Biosciences**, New Delhi, v. 11, p. 155–158, 2002.

VIEGAS, E. C. et al. Toxicidade de óleos essenciais de alho e casca de canela contra fungos do grupo *Aspergillus flavus*. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 4, p. 915-919, out./dez. 2005.

VILA, M. T. R. et al. Caracterização química e bioquímica de goiabas armazenadas sob refrigeração e atmosfera modificada. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 5, p. 1435-1442, set./out. 2007.

VILAS BOAS, E. V. B.; CHITARRA, M. I. F.; RESENDE, J. M. Uso de atmosfera modificada na conservação pós-colheita do maracujá amarelo. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 1, p-159-168, jan./fev. 2001.

WATANABE, H. S. Comercialização de goiaba no mercado nacional. In: NATALE, W. et al. (Ed.). **Cultura da goiaba: do plantio à comercialização**. Jaboticabal: FCAV, 2009. p. 133-150.

WERNER, E. T. et al. Efeito do cloreto de cálcio na pós-colheita de goiaba Cortibel. **Bragantia**, Campinas, v. 68, n. 2, p. 511-518, 2009.

WISNIEWSKI, M. E.; WILSON, C. L. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: Recent advances. **Hortscience**, Alexandria, v. 27, n. 2, p. 94-98, Feb. 1992.

XISTO, A. L. R. P. et al. Textura de goiabas "Pedro Sato" submetidas à aplicação de cloreto de cálcio. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 1, p. 113-118, jan./fev. 2004.

ZADOKS, J. C. The costs of change in plant protection. **Journal of Plant Protection in the Tropics**, Kuala Lumpur, v. 9, p. 151-159, 1992.

ZAMBONELLI, A. et al. Effects of essential oils on phytopathogenic fungi in vitro. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 144, n. 2, p. 491-494, Feb. 1996.

CAPÍTULO 2

**Composição química e atividade antifúngica de óleos essenciais sobre
Colletotrichum gloeosporioides e *Colletotrichum musae***

RESUMO

Este trabalho foi realizado com os objetivos de avaliar a atividade antifúngica de compostos voláteis sobre o crescimento micelial e de compostos voláteis e fixos de 25 OE sobre a germinação e a formação de apressórios de *C. gloeosporioides* e *C. musae*, *in vitro*; identificar os componentes dos OE por meio de cromatografia gasosa e espectrometria de massa e determinar a fração antifúngica desses por meio de cromatografia em camada delgada. Para a avaliação da atividade antifúngica dos compostos voláteis, alíquotas de 6,67 μL dos OE foram pipetadas sobre papel de filtro em três pontos equidistantes e discos dos patógenos foram repicados no centro de placas de Petri contendo BDA. Canela, erva-baleeira, cravo-da-índia, atroveran, orégano, erva-doce e tomilho inibiram totalmente o crescimento micelial dos fungos, este também inibido por capim-limão, palmarosa, louro, alfazema, menta e manjericão. Na fase de contato, alíquotas de 80 μL das soluções dos OE a 0,2, 1,0 e 5,0 mL.L^{-1} e de conídios (3×10^3 conídios. mL^{-1}), preparadas em água destilada e esterilizada com Tween a 1,0%, foram depositadas em poços de placas de Elisa. Após 12 horas de incubação a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, de *C. gloeosporioides* (luz) e *C. musae* (escuro), paralisou-se a germinação. Em microscópio de luz foram avaliados 50 conídios em 12 poços por tratamento, considerando-se como germinação qualquer emissão de tubo germinativo. Manjericão, erva-doce, menta, camomila, erva-baleeira, louro e orégano a 5,0 mL.L^{-1} ; palmarosa, cravo-da-índia, tomilho e capim-limão a 1,0 e a 5,0 mL.L^{-1} e canela a 0,2, 1,0 e 5,0 mL.L^{-1} inibiram totalmente a germinação de conídios dos patógenos. A germinação de *C. musae* foi também inibida por atroveran, melaleuca, laranja-doce, alfazema e gengibre, a 5,0 mL.L^{-1} ; erva-doce e menta, a 0,2 e a 1,0 mL.L^{-1}) e capim-limão, a 0,2 mL.L^{-1} . Observou-se apenas inibição total na formação de apressórios de *C. musae* por *Chamaecyparis plumosa*. Em cromatógrafo foram identificados 70 compostos. Pela eliminação dos OE que não apresentaram atividade antifúngica, inferiu-se que 39 compostos podem ter inibido os patógenos isoladamente ou em sinergismo. Placas cromatográficas, após aplicação dos OE, foram eluídas em tolueno:acetato de etila, secas em estufa, por uma noite, acondicionadas em placas de Petri e recobertas com BDA acrescido das suspensões de conídios e incubadas em BOD a 25°C sob fotoperíodo de 12 horas. Os halos de inibição nelas formados indicaram as frações antifúngicas de cravo-da-índia, capim-limão, orégano, louro, erva-doce, manjericão, palmarosa, tomilho, canela e camomila sobre *C. gloeosporioides* e *C. musae*, 4 e 5 dias após o recobrimento, respectivamente, e também de gengibre e atroveran sobre *C. musae*.

Palavras-chave: Controle alternativo. Fungos fitopatogênicos. Cromatografia gasosa e espectrometria de massa. Bioautografia.

ABSTRACT

The objectives of the study was to evaluate the antifungal activity of volatile compounds on micelial growth and volatile and fixed compounds of 25 essential oils on germination and formation of appressoria of *C. gloeosporioides* and *C. musae*, *in vitro*; identify the essential oil components through gas chromatography and mass spectrometry and to determine their antifungal fraction through thin layer chromatography. For the evaluation of the antifungal activity of the volatile compounds, 6.67 μL aliquots of the oils were pour on filter paper at 3 equidistant points and disks of the pathogens were placed in the center of Petri dishes containing PDA. Cinnamon bark, black sage, Indian clove, atroveran, oregano, anis and thyme totally inhibited the micelial growth of *C. gloeosporioides* and *C. musae*, the latter also inhibited by lemongrass, palmarosa, laurel, lavender, mint and basil. And, in the contact phase, 80 μL aliquots of the oil solutions at 0.2, 1.0 and 5.0 mL.L^{-1} and conidia (3×10^3 conidia. mL^{-1}) prepared in distilled sterilized water with 1.0% Tween were deposited in Elisa well plates. After 12 hours of incubation at 25 ± 2 °C, the germination of *C. gloeosporioides* (light) and *C. musae* (darkness) was paralyzed. In a light microscope 50 conidia in 12 wells per treatment were appraised, considering as germination, any germinative tube emission. Basil, anis, mint, chamomile, black sage, laurel and oregano at 5.0 mL.L^{-1} ; palmarosa, clove, thyme and lemongrass at 1.0 and 5.0 mL.L^{-1} ; and cinnamon bark at 0.2, 1.0 and 5.0 mL.L^{-1} totally inhibited the germination of the pathogen conidia. The germination of *C. musae* was also inhibited by atroveran, tea tree, sweet orange, lavender and ginger at 5.0 mL.L^{-1} ; anis and mint (at 0.2 and 1.0 mL.L^{-1}), and lemongrass at 0.2 mL.L^{-1} . Total inhibition of the *C. musae* appressoria formation was only observed for *Chamaecyparis plumosa*. In the chromatograph, 70 compounds were identified. By the elimination of the essential oils that did not present antifungal activity it was inferred that 39 compounds might have inhibited the pathogens separately or in synergism. In layer chromatography plates that were eluted in toluene: ethyl acetate after application of the essential oils, oven-dried overnight, conditioned in Petri dishes re-coated with PDA added with the conidia suspensions and incubated in BOD at 25 °C under a 12 hour photoperiod, the inhibition halos formed indicated the antifungal fractions of Indian clove, lemongrass, oregano, laurel, anis, basil, palmarosa, thyme, cinnamon bark and chamomile on *C. gloeosporioides* and *C. musae*, 4 and 5 days after the coating, respectively, and also of ginger and atroveran on *C. musae*.

Keywords: Alternative control. Plant pathogenic fungi. Gas chromatography mass spectrometry. Bioautography technique.

1 INTRODUÇÃO

A antracnose causada por *Colletotrichum gloeosporioides* em frutos tropicais como abacate, goiaba, mamão, manga e maracujá e *Colletotrichum musae* em banana constitui um problema importante em pós-colheita (PERES et al., 2002). Esses fungos do gênero *Colletotrichum* podem provocar infecções latentes, penetrando nos frutos ainda verdes e permanecendo inativos até o amadurecimento (AMORIM, 1995). Então, frutos portadores de infecções latentes ou quiescentes, que aparentam completa sanidade quando colhidos, estarão sujeitos a perdas significativas durante o armazenamento (JARVIS, 1994).

Os fungicidas constituem a principal medida de controle de doenças em pós-colheita (ECKERT; OGAWA, 1985; TRIPATHI; DUBEY, 2004; SHARMA; TRIPATHI, 2006). Entretanto, ainda que as culturas tenham sido submetidas ao controle químico, perdas significativas decorrentes de podridões patológicas que ocasionam redução do período de comercialização, desclassificação e descarte de produtos, comprometendo o aspecto econômico, evidenciam a ineficiência dos tratamentos realizados. Em alguns casos, o controle químico apresenta-se como uma tecnologia agressiva em função da utilização exacerbada, indiscriminada e contínua. A contaminação de produtos hortícolas por resíduos de agrotóxicos tem sido alvo da mídia, causando impactos negativos à cadeia produtiva das frutas e hortaliças, principalmente pela aplicação de agrotóxicos em dosagem excessiva ou de produtos não recomendados (MELO, 2006), tanto em pré como em pós-colheita. O uso contínuo de fungicidas pode promover a seleção de fungos patogênicos resistentes (GHINI; KIMATI, 2002).

Diante do exposto, em concordância com Wisniewski e Wilson (1992), faz-se necessário e urgente o desenvolvimento de métodos alternativos e

eficazes para o controle de doenças pós-colheita, mediante o uso de técnicas não químicas e tratamentos com fungicidas não seletivos, considerados seguros pelos consumidores, não apresentando risco para a saúde humana e o meio ambiente.

Para o controle de doenças em pós-colheita, representando menor risco para a saúde humana e para o ambiente, uma possibilidade é a utilização de produtos naturais obtidos de plantas (KULAKIOTU; THANASSOULOPOULOS; SFAKIOTAKIS, 2004), como os óleos essenciais largamente utilizados especialmente na indústria farmacêutica pelas propriedades antibacteriana, antifúngica e inseticida, já observadas na natureza (BAKKALI et al., 2008).

Trabalhos desenvolvidos com extratos brutos ou óleos essenciais obtidos a partir de plantas medicinais da flora nativa têm indicado o potencial no controle de fitopatógenos, tanto por sua ação fungitóxica direta, inibindo o crescimento micelial e a germinação de esporos, quanto pela ativação de mecanismos de defesa como a indução de fitoalexinas, indicando a presença de composto(s) com característica de elicitador(es) (STANGARLIN et al., 1999). Nos últimos anos, o interesse em substâncias naturais aumentou e vários estudos sobre a atividade biocida de uma ampla gama de metabólitos secundários têm sido relatados. O uso potencial de fungicidas voláteis para o controle de doenças em pós-colheita requer um exame detalhado das atividades biológicas e dispersão no tecido da fruta e o desenvolvimento de fórmulas que inibem o crescimento dos patógenos sem produzir efeito fitotóxico nos frutos (MARI; BERTOLINI; PRATELLA, 2003).

Para a seleção de produtos naturais com potencial de uso no controle de fitopatógenos, ensaios *in vitro* apresentam-se como ponto de partida. Alguns autores relataram a eficiência da atividade antifúngica dos óleos essenciais *in vitro* e *in vivo* no controle de patógenos (REDDY et al., 1998; CHU; LIU; ZHOU, 2001; SINGH et al., 2002; RANASINGHE; JAYAWARDENA;

ABEYWICKRAMA, 2002; PLOTTO; ROBERTS; ROBERTS, 2003; EDRIS; FARRAG, 2003; TRIPATHI et al., 2004; SALGADO et al., 2004; SOYLU; SOYLU; KURT, 2006; SHARMA; TRIPATHI, 2006; AZIZI et al., 2008; TZORTZAKIS; ECONOMAKIS, 2007; LEE et al., 2007; NERI et al., 2007, BARRERA-NECHA et al., 2008; AMIRI et al., 2008; SUKATTA et al., 2008; ROZWALKA et al., 2008; TRIPATHI; SHUKLA, 2009; TZORTZAKIS, 2009; SOUZA JÚNIOR; SALES; MARTINS, 2009; CORATO et al., 2010). Entretanto, para *Colletotrichum* sp., os estudos são em número reduzido.

Considerando-se as múltiplas atividades biológicas de óleos essenciais e ou dos seus compostos puros, mais pesquisas devem envolver investigações sobre formulações de produtos, mistura eficaz de compostos isolados e em dosagens adequadas, para que ocorra a proteção fitossanitária eficiente sem efeitos colaterais fitotóxicos (RIEFLER; NOVAK; KOSCHIER., 2009). A determinação da atividade biológica dos metabólitos secundários das plantas medicinais com respeito à atividade antimicrobiana direta ou ativando mecanismos de defesa das plantas tratadas, bem como o fracionamento e a identificação desses metabólitos poderão contribuir para a aquisição de maiores conhecimentos que reforcem sua possível utilização como um método alternativo de controle de doença de plantas (STANGARLIN et al., 1999) em pós-colheita, atendendo aos preceitos da agricultura alternativa.

Nesse contexto, o presente trabalho foi realizado com os objetivos de avaliar a atividade antifúngica de compostos voláteis (fase de vapor) sobre crescimento micelial e de compostos voláteis e fixos (fase de contato) de óleos essenciais sobre germinação e formação de apressórios de *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum musae*, *in vitro*; identificar os componentes dos óleos essenciais por meio de cromatografia gasosa e espectrometria de massa e determinar a fração antifúngica dos óleos essenciais sobre os patógenos por meio de cromatografia em camada delgada.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Diagnose e Controle de Doenças de Plantas, no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural (LME), do Departamento de Fitopatologia (DFP), na Central de Análise e Prospecção Química do Departamento de Química (DQI), na Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, MG e no Laboratório de Fitoquímica do Departamento de Farmácia na Universidade Federal do Paraná (UFPR), em Curitiba, PR, no período de junho de 2008 a dezembro de 2009.

2.2 Obtenção dos isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum musae* e verificação de patogenicidade

Os isolados de *C. gloeosporioides* e *C. musae* foram obtidos a partir de lesões em frutos maduros de goiabeira (cv. Pedro Sato) e bananeira (cv. Prata), adquiridos no comércio e de produtor local, respectivamente. Por meio de isolamento direto, estruturas fúngicas foram transferidas para meio ágar-água em placas de Petri. No isolamento indireto, pequenos pedaços de tecidos lesionados foram desinfestados em álcool a 70%, hipoclorito de sódio a 2% (NaClO 2%) e lavados com água esterilizada (3 vezes). Os isolados purificados foram mantidos em meio BDA (batata-dextrose-ágar) em câmaras de crescimento, a 25°C e fotoperíodo de 12 horas. Para a verificação de patogenicidade, goiabas e banana, previamente lavados em água corrente e desinfestados com hipoclorito de sódio a 2% (NaClO 2%), foram inoculados com os isolados de *C. gloeosporioides* e *C. musae*, respectivamente, em áreas demarcadas contendo ferimentos feitos com estilete e sem ferimentos e mantidos em câmara úmida a temperatura ambiente.

2.3 Obtenção dos óleos essenciais

Os óleos essenciais foram selecionados em função da disponibilidade no comércio e ou disponibilidade de material vegetal para extração (Tabela 1).

Tabela 1 Óleos essenciais extraídos de plantas medicinais, aromáticas e ornamentais selecionados para a avaliação de atividade antifúngica sobre *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum musae*.

Nome científico	Nome comum
<i>Baccharis dracunculifolia</i>	Alecrim-do-campo
<i>Chamaecyparis plumosa</i>	Tuia-áurea
<i>Chamaecyparis psifera</i>	Tuia-europa
<i>Cinnamomum</i> sp.	Canela
<i>Citrus limon</i>	Limão-siciliano
<i>Citrus sinensis</i>	Laranja-doce
<i>Cordia verbenacea</i>	Erva-baleeira
<i>Cymbopogon citratus</i>	Capim-limão
<i>Cymbopogon martinii</i>	Palmarosa
<i>Eucalyptus citriodora</i>	Eucalipto
<i>Eucalyptus globulus</i>	Eucalipto
<i>Eugenia caryophyllata</i>	Cravo-da-índia
<i>Lavandula officinalis</i>	Alfazema
<i>Laurus nobilis</i>	Louro
<i>Lippia citriodora</i>	Cidrao
<i>Matricaria recutita</i>	Camomila
<i>Melaleuca alternifolia</i>	Melaleuca
<i>Mentha arvensis</i>	Menta
<i>Ocimum basilicum</i>	Manjericao
<i>Ocimum selloi</i>	Atroveran
<i>Origanum vulgare</i>	Orégano
<i>Pimpinella anisum</i>	Erva-doce
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Alecrim
<i>Thymus vulgaris</i>	Tomilho
<i>Zingiber officinale</i>	Gengibre

Os óleos essenciais de *Lavandula officinalis* (alfazema), *Ocimum selloi* (atroveran), *Origanum vulgare* (orégano) e *Cinnamomum* sp. (canela) foram extraídos por hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger, sob aquecimento

contínuo, durante três horas, após o surgimento da primeira gota resultante da condensação do vapor d'água arrastado. Alfazema, atroveran e orégano foram obtidos no Horto de Plantas Medicinais do Departamento de Agricultura (DAG) da UFLA e canela (casca) no comércio local. Os demais óleos essenciais foram fornecidos pela Chamel Indústria e Comércio de Produtos Naturais, Paraná, Brasil (2008). Todos os óleos foram mantidos sob refrigeração em freezer e protegidos da luz em frascos âmbar.

2.4 Atividade de compostos voláteis e fixos de óleos essenciais sobre crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum musae*, *in vitro*

Alíquotas de 6,67 μL dos óleos essenciais de *Baccharis dracunculifolia*, *Chamaecyparis plumosa*, *Chamaecyparis psifera*, *Cinnamomum* sp., *Citrus limon*, *Citrus sinensis*, *Cordia verbenacea*, *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon martinii*, *Eucalyptus citriodora*, *Eucalyptus globulus*, *Eugenia caryophyllata*, *Lavandula officinalis*, *Laurus nobilis*, *Lippia citriodora*, *Matricaria recutita*, *Melaleuca alternifolia*, *Mentha arvensis*, *Ocimum basilicum*, *Ocimum selloi*, *Origanum vulgare*, *Pimpinella anisum*, *Rosmarinus officinalis*, *Thymus vulgaris* e *Zingiber officinale* foram pipetadas sobre papel de filtro em três pontos equidistantes em placas de Petri (9 cm) contendo meio BDA (batata-dextrose-ágar), totalizando 20 μL por placa ou 20 μL em 47,71 cm^3 ou 0,42 $\mu\text{L}\cdot\text{cm}^{-3}$.

Discos de 5 mm dos isolados dos patógenos *C. gloeosporioides* e *C. musae* foram repicados, separadamente, para o centro das placas de Petri, vedadas com filme e incubadas em BOD, a 24 \pm 2°C, sob fotoperíodo de 12 horas.

O crescimento micelial foi avaliado por meio de medição de dois eixos do diâmetro das colônias, diariamente, até os patógenos atingirem as bordas das

placas no controle em BDA ou em qualquer tratamento.

O índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) foi calculado pela fórmula de Maguire (1962), adaptada por Oliveira (1991), em que

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

IVCM = índice de velocidade de crescimento micelial, D = diâmetro médio atual, D_a = diâmetro médio do dia anterior e N = número de dias após a inoculação.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), esquema fatorial (óleos x controle x concentrações) x 4 repetições, com cada placa constituindo uma unidade experimental. A análise estatística foi realizada pelo programa R Development Core Team (2010), com análise de variância e comparação de médias obtidas pelo teste Scott-Knott, a 5% ($p \leq 0,05$) de probabilidade de erro.

2.5 Atividade de óleos essenciais sobre a germinação e formação de apressórios de *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum musae*, *in vitro*

Para a avaliação da atividade antifúngica sobre a germinação e a formação de apressórios de *C. gloeosporioides* e *C. musae*, alíquotas de 40 μL dos tratamentos contendo óleos essenciais nas concentrações de 0,02% (200 $\mu\text{L.L}^{-1}$), 0,1% (1000 $\mu\text{L.L}^{-1}$) e 0,5% (5000 $\mu\text{L.L}^{-1}$) e 40 μL da suspensão de conídios (3×10^3 conídios. mL^{-1}) foram depositadas nos orifícios das placas de Elisa. Para o controle, 40 μL da suspensão de conídios foram misturados a 40 μL de água destilada e esterilizada.

Mediante tal procedimento, foi necessário o preparo das concentrações a 0,04%, 0,2% e 1,0%, considerando a diluição das mesmas na suspensão de conídios.

Para cada tratamento, foram preparados 5 mL, utilizando-se água destilada e esterilizada com Tween a 1%.

Para a obtenção das concentrações a 0,04%, 0,2% e 1,0%, dos 5 mL foram retirados 2 µL, 10 µL e 50 µL de água e adicionados 2 µL, 10 µL e 50 µL dos óleos essenciais, respectivamente.

A paralisação da germinação de *C. gloeosporioides* (luz) e *C. musae* (escuro) foi feita após 12 horas de incubação, à temperatura de 25 ± 2 °C, utilizando-se 20 µL do corante azul de algodão com lactoglicerol.

Em microscópio de luz, foram avaliados 50 esporos em 12 orifícios/repetições, totalizando 600 esporos por tratamento. Os esporos que apresentaram qualquer emissão de tubo germinativo foram considerados como germinados.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), esquema fatorial (óleos x controle x concentrações) x 12 repetições, com cada orifício da placa de Elisa, constituindo uma unidade experimental. A análise estatística foi realizada pelo programa R Development Core Team (2010), com análise de variância e comparação de médias obtidas pelo teste Scott-Knott, a 5% ($p\leq 0,05$) de probabilidade de erro.

2.6 Identificação da composição química de óleos essenciais - Perfil cromatográfico de óleos essenciais

Para a identificação dos componentes, as amostras dos óleos essenciais foram preparadas em 0,5 mL de diclorometano (CH_2Cl_2) e 1 µL imediatamente injetado no cromatógrafo a gás acoplado a detector de massas (GCMS-QP2010 Plus, Shimadzu), na ordem apresentada na Tabela 2.

Tabela 2 Amostras de óleos essenciais (mg) preparadas em 0,5 mL de diclorometano (CH_2Cl_2) para a determinação de composição química em cromatógrafo a gás acoplado a detector de massas GCMS-QP2010 Plus, Shimadzu).

Óleos essenciais		Quantidade (mg) em 0,5 mL de CH_2Cl_2^*
Nome científico	Nome comum	
<i>Laurus nobilis</i>	louro	0,125
<i>Thymus vulgaris</i>	tomilho	0,147
<i>Lippia citriodora</i>	cidrão	0,155
<i>Origanum vulgare</i>	orégano	0,103
<i>Cordia verbenacea</i>	erva-baleeira	0,179
<i>Cymbopogon citratus</i>	capim-limão	0,160
<i>Eugenia caryophyllata</i>	cravo-da-índia	0,200
<i>Citrus sinensis</i>	laranja-doce	0,172
<i>Pimpinella anisum</i>	erva-doce	0,121
<i>Citrus limon</i>	limão-siciliano	0,136
<i>Rosmarinus officinalis</i>	alecrim	0,189
<i>Chamaecyparis plumosa</i>	tuia-áurea	0,179
<i>Matricaria recutita</i>	camomila	0,127
<i>Zingiber officinale</i>	gingibre	0,108
<i>Cymbopogon martinii</i>	palmarosa	0,144
<i>Eucalyptus citriodora</i>	eucalipto	0,175
<i>Ocimum basilicum</i>	manjeriço	0,158
<i>Melaleuca alternifolia</i>	melaleuca	0,125
<i>Eucalyptus globulus</i>	eucalipto	0,135
<i>Mentha arvensis</i>	menta	0,175
<i>Chamaecyparis psifera</i>	tuia-europa	0,141
<i>Baccharis dracunculifolia</i>	alecrim-do-campo	0,105
<i>Lavandula officinalis</i>	alfazema	0,121
<i>Ocimum selloi</i>	atroveran	0,121
<i>Cinnamomum sp.</i>	canela	0,118

* diclorometano

As análises cromatográficas foram feitas em cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro (detector) de massas (GCMS-QP2010 Plus, Shimadzu). O cromatógrafo gasoso utilizou o hélio ultrapuro como gás de arraste com fluxo de $1,8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, temperatura do injetor em 220°C , modo de injeção Split de 1:15, injeção manual, tempo de corrida estabelecido em 77 minutos, em coluna Equily-5 (30 m x 0,22 mm x 0,25 μm), com forno da

coluna, a 60°C, por 2 minutos, aquecimento a 3°C.min⁻¹ até 240°C, permanecendo em 240°C por 15 minutos. O espectrômetro de massas utilizou a interface GC-MS, a 250°C, com fonte de íons a 200°C e modo de ionização por impacto de elétrons a 70eV.

Os componentes dos óleos essenciais foram identificados mediante comparação dos índices de similaridade de espectro de massa (áreas relativas em porcentagem) apresentados com os dados disponíveis na biblioteca Wiley 8 do próprio cromatógrafo GCMS-QP2010 Plus (Shimadzu).

2.7 Determinação da fração antifúngica dos óleos essenciais sobre *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum musae* por meio de cromatografia em camada delgada - bioautografia

2.7.1 Determinação da fase móvel (solvente de eluição)

Para a determinação da fase móvel ou solvente de eluição mais eficiente no fracionamento dos óleos essenciais foram utilizadas placa de cromatografia ou cromatofolha de sílica gel 60 TLC (Thin Layer Chromatography), em alumínio sem indicador de fluorescência, 20 x 20 cm, espessura 0,2 mm, MERCK, produto n°. 1.05553.0001.

As placas de cromatografia ou cromatofolhas de sílica-gel redimensionadas para 10 x 20 cm, em duplicata, após aplicação dos óleos essenciais a 0,5 cm da base com o auxílio de tubos capilares de vidro, foram eluídas com diclorometano, hexano, diclorometano:hexano e tolueno:acetato de etila, na proporção 93:7, em cuba cromatográfica, até o solvente atingir a linha determinada como limite de eluição. Foram, então, secas em estufa, a 60°C e as frações observadas sob luz de ultravioleta (UV) com comprimento de onda de 254 nm e por meio de revelação com vanilina sulfúrica (10 mL de ácido sulfúrico (H₂SO) concentrado, 45 mL de etanol puro, 10 mL de água destilada, 1

g de vanilina), tendo os melhores resultados sido registrados com câmera fotográfica digital.

2.7.2 Determinação da fração antifúngica dos óleos essenciais sobre *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum musae* por meio de cromatografia em camada delgada - bioautografia

As frações antifúngicas dos óleos essenciais sobre *C. gloeosporioides* e *C. musae* foram determinadas com base na técnica de bioautografia em cromatografia de camada delgada.

Foram utilizadas placas cromatográficas de sílica-gel (2,0 x 10,0 cm), com ponto de aplicação do óleo essencial e limite máximo de corrida ou eluição pré-determinados a 0,7 e 0,5 cm das extremidades com linhas feitas com lápis, respectivamente, sendo a distância de corrida estabelecida em 8,8 cm. Para a uniformidade da eluição ou corrida, as pontas das placas próximas ao ponto de aplicação dos óleos foram cortadas em bisel.

Após aplicação das alíquotas de 2 µl dos óleos essenciais nos pontos pré-determinados nas placas (em duplicata), em cuba cromatográfica foram feitas as eluições até o solvente de eluição tolueno:acetato de etila (93:7) atingir o limite máximo de corrida. As placas cromatográficas foram secas em estufa, a 60°C, por uma noite, acondicionadas em placas de Petri (15,0 cm de diâmetro) e recobertas com meio batata-dextrose-ágar (BDA) acrescido das suspensões de conídios (1×10^5 conídios.mL⁻¹) de *C. gloeosporioides* e *C. musae* e incubadas em estufa BOD, a 25°C, sob fotoperíodo de 12 horas, até o aparecimento de halos de inibição, que indicaram as frações antifúngicas dos óleos essenciais.

O fator de retenção (Rf) foi determinado pela relação ou quociente das distâncias percorridas pelos óleos desde a origem (ponto de aplicação) até o centro do halo de inibição e a distância máxima percorrida pelo eluente

(distância pré-determinada como limite de eluição). Também foram determinados os comprimentos das bandas das frações antifúngicas.

2.7.3 Identificação dos compostos das frações antifúngicas dos óleos essenciais sobre *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum musae* em fase fixa ou estacionária por meio de cromatografia gasosa

Para a identificação dos compostos das frações antifúngicas da fase fixa ou estacionária, foram utilizadas placas eluídas quando da montagem do experimento, como descrito anteriormente. Após a marcação das bandas, procedeu-se a raspagem das frações antifúngicas que, misturadas ao diclorometano, foram agitadas e filtradas a vácuo em funil de vidro sinterizado e injetadas em cromatógrafo a gás acoplado a detector de massas (GCMS-QP2010 Plus, Shimadzu).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Atividade antifúngica de compostos voláteis e fixos de óleos essenciais sobre crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum musae*, *in vitro*

A ação fungitóxica dos compostos voláteis dos óleos essenciais de canela, erva-baleeira, cravo-da-índia, atroveran, orégano, erva-doce e tomilho foi comprovada pela inibição total do crescimento micelial de *C. gloeosporioides*.

A inibição total do crescimento micelial de *C. musae* foi verificada na presença dos óleos essenciais de canela, erva-baleeira, capim-limão, palmarosa, cravo-da-índia, louro, alfazema, menta, manjerição, atroveran, orégano, erva-doce e tomilho.

A ação fungistática dos óleos essenciais sobre *C. gloeosporioides* foi evidenciada pelo crescimento micelial observado nos tratamentos com capim-limão e menta, a partir do 5º e do 7º dias, respectivamente, em 50% das placas.

Nos tratamentos contendo os óleos essenciais de camomila, gengibre, cidrão e alecrim-do-campo, foram observados halos de inibição evidenciando a presença de compostos fixos com ação fungitóxica sobre *C. musae* e *C. gloeosporioides* aos 6 e aos 7 dias, respectivamente.

Observou-se redução superior a 50% do índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) de *C. gloeosporioides* com a utilização dos óleos essenciais de menta (97,97%), capim-limão (77,95%), manjerição (60,99%), alfazema (55,77%) e louro (55,39%). Redução superior a 50% do índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) de *C. musae* foi observada na presença dos óleos essenciais de manjerição (99,66%), louro (99,41%), erva-baleeira (97,39%), gengibre (85,16%), eucalipto (*Eucalyptus citriodora*)

(80,42%), melaleuca (70,00%), alecrim-do-campo (66,73%), alecrim (62,04%), cidrão (61,20%), laranja-doce (59,42%) e tuia-áurea (54,22%).

O índice de velocidade de crescimento de *C. gloeosporioides* e *C. musae*, com as respectivas taxas de crescimento em diâmetro por dia (cm.dia^{-1}), pode ser observado nas Figuras 1 e 2.

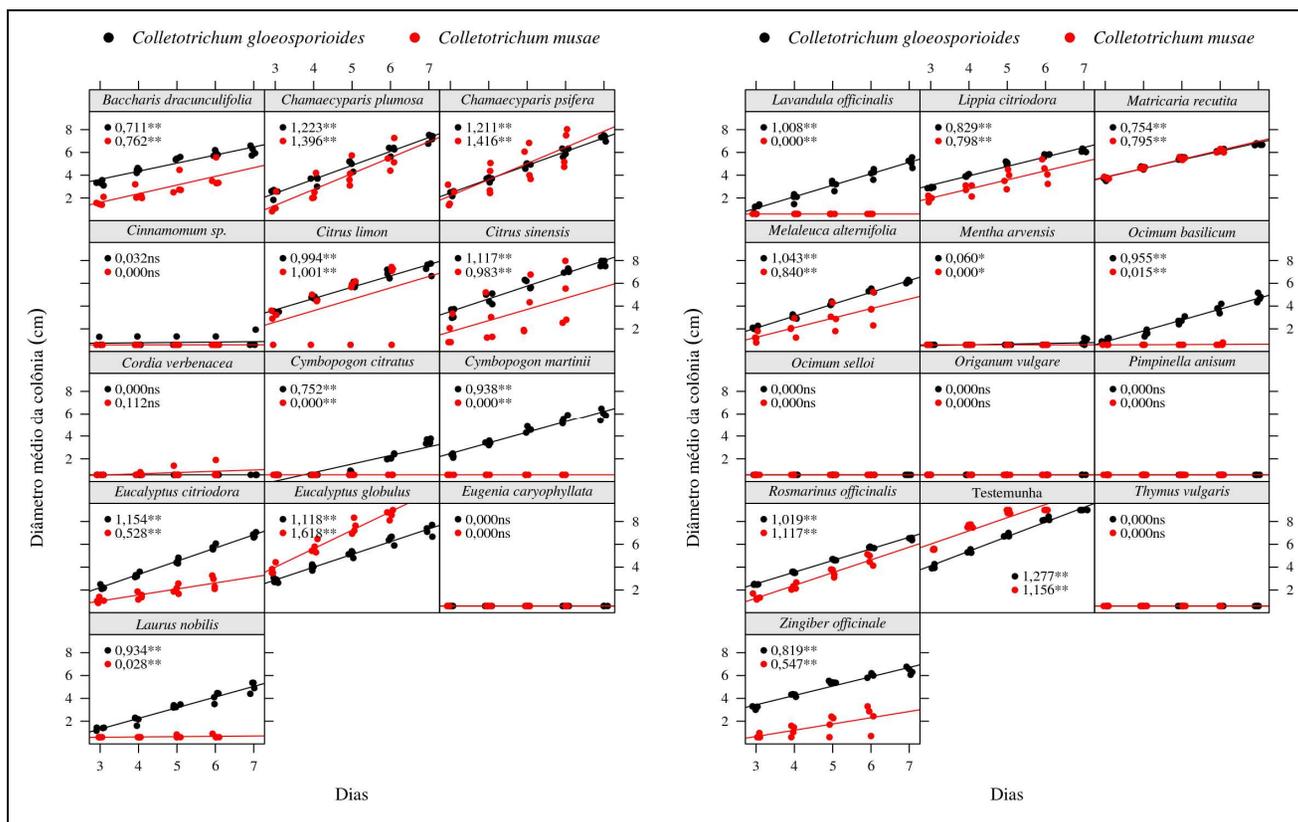


Figura 1 Índice de velocidade de crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum musae*, *in vitro*, expostos aos óleos essenciais na dose de 20 μ L por placa de Petri.

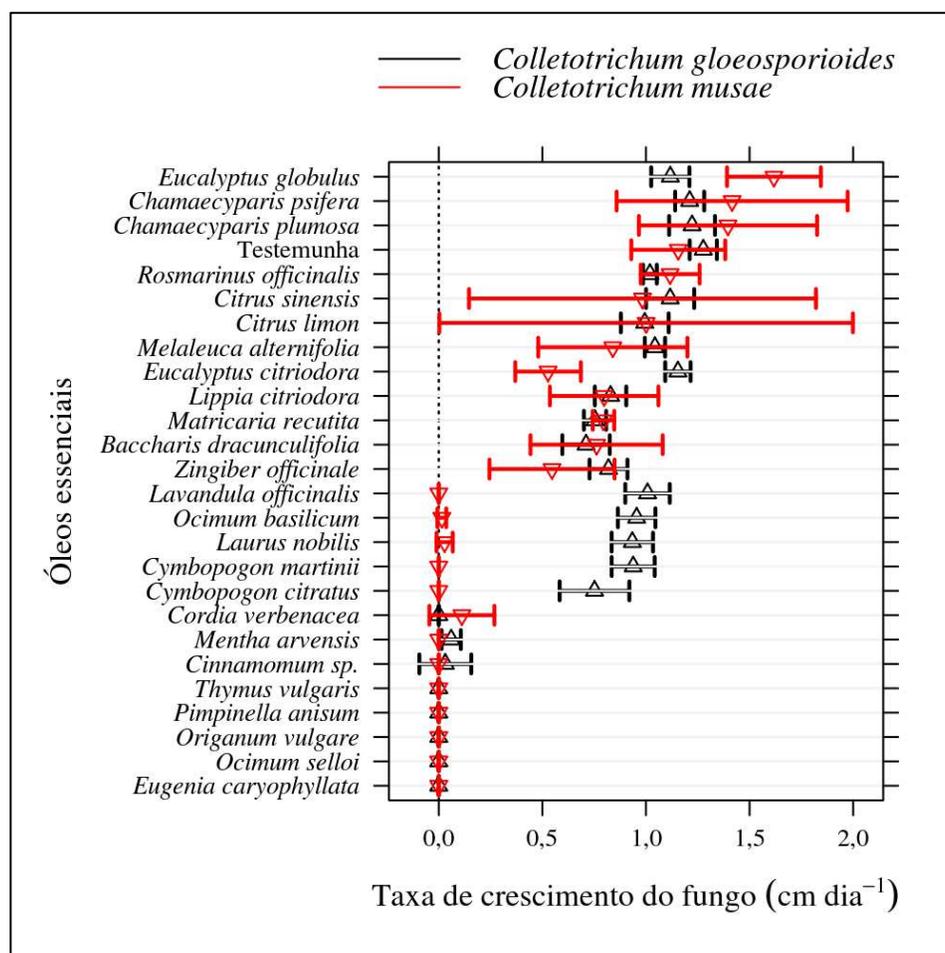


Figura 2 Taxa de crescimento micelial (cm.dia⁻¹) de *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum musae*, *in vitro*, expostos aos compostos voláteis de óleos essenciais na dose de 20 μ L por placa de Petri, com intervalo de confiança de 95%.

3.2 Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre a germinação e a formação de apressórios de *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum musae*, *in vitro*

Os óleos essenciais de manjeriço, erva-doce, menta, camomila, erva-

baleeira, louro, orégano a 0,5% (5000 $\mu\text{L.L}^{-1}$), palmarosa, cravo-da-índia, tomilho e capim-limão a 0,5% (5000 $\mu\text{L.L}^{-1}$) e a 0,1% (1000 $\mu\text{L.L}^{-1}$) e canela a 0,5% (5000 $\mu\text{L.L}^{-1}$), 0,1% (1000 $\mu\text{L.L}^{-1}$) e 0,02% (200 $\mu\text{L.L}^{-1}$) inibiram totalmente a germinação de conídios de *C. gloeosporioides* e *C. musae* (Figuras 3 e 4).

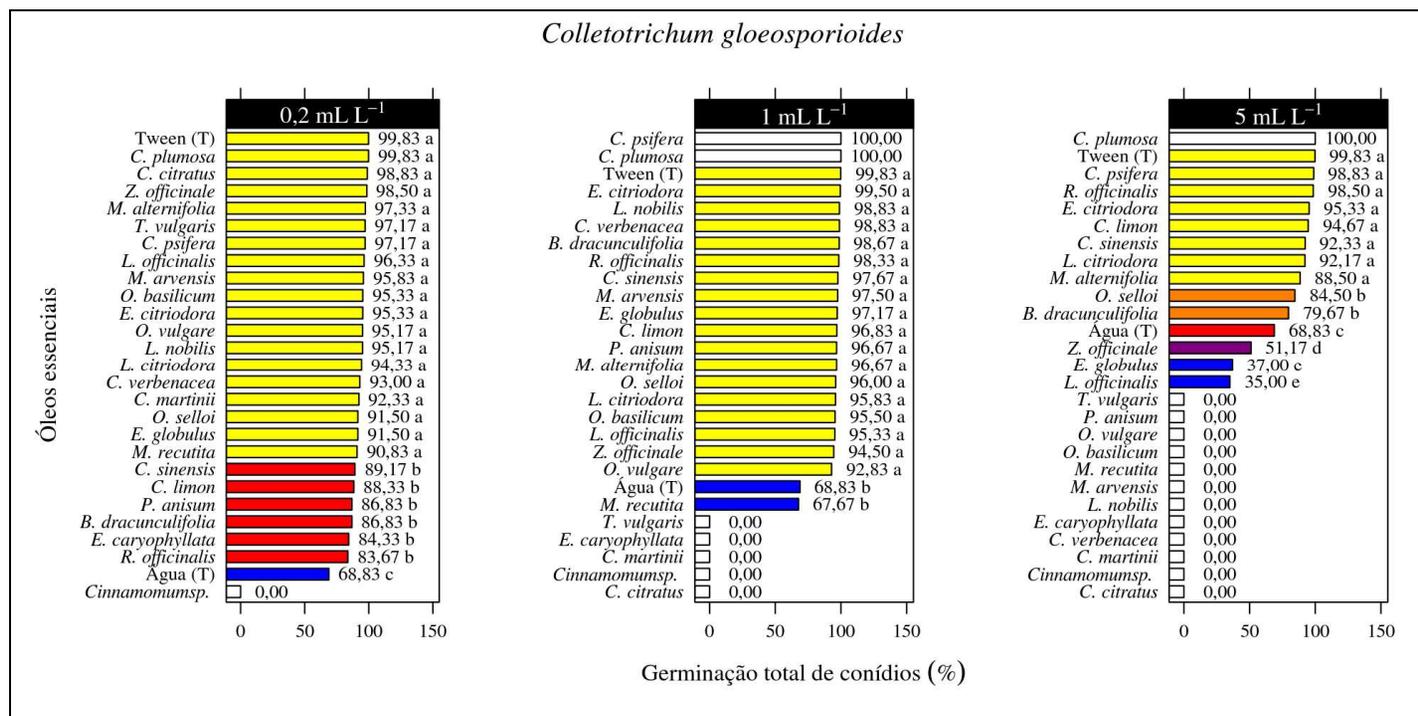


Figura 3 Germinação (%) de conídios de *Colletotrichum gloeosporioides* em diferentes concentrações (0,2 mL.L⁻¹, 1 mL.L⁻¹ e 5 mL.L⁻¹) de óleos essenciais, *in vitro*. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

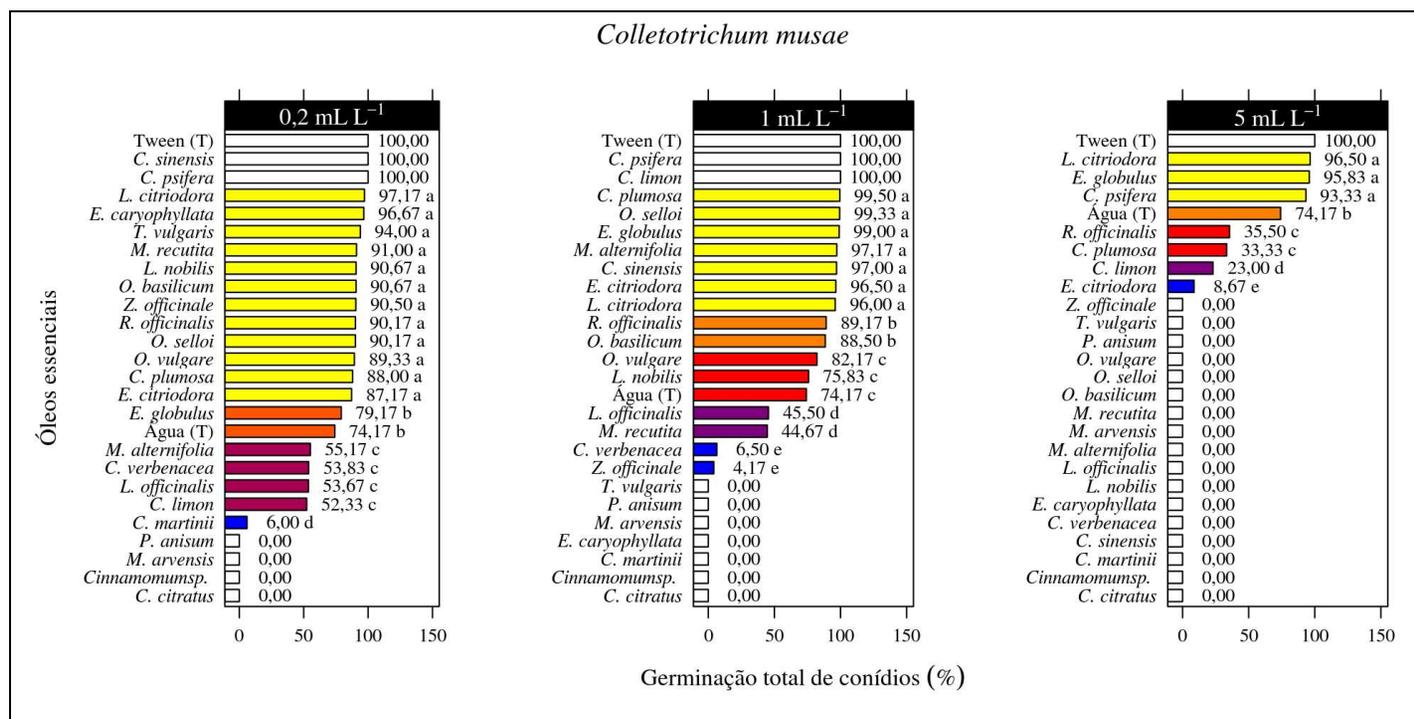


Figura 4 Germinação (%) de conídios de *Colletotrichum musae* em diferentes concentrações (0,2 mL.L⁻¹, 1 mL.L⁻¹ e 5 mL.L⁻¹) de óleos essenciais, *in vitro*. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

A inibição total de conídios de *C. musae* foi também observada para os óleos essenciais de atoveran, melaleuca, laranja-doce, alfazema e gengibre a 0,5% (5000 $\mu\text{L.L}^{-1}$) e erva-doce, menta e capim-limão a 0,02% (200 $\mu\text{L.L}^{-1}$). Os óleos essenciais de erva-baleeira e gengibre a 0,1% (1000 $\mu\text{L.L}^{-1}$) e palmarosa a 0,02% (200 $\mu\text{L.L}^{-1}$) apresentaram inibição de 93,5%, 95,83% e 94,00%, respectivamente.

Na concentração 0,5% (5000 $\mu\text{L.L}^{-1}$), os óleos essenciais de alecrim (64,50%), tuia-áurea (66,67%), limão-siciliano (69,50%) e eucalipto (*Eucalyptus citriodora*) (91,33%) promoveram inibição parcial, superior a 50%, sobre a germinação de *C. gloeosporioides*, e gengibre (48,83%), eucalipto (*Eucalyptus globulus*) (54,67%) e alfazema (64,83%) sobre *C. musae*.

Na avaliação da atividade antifúngica, o emulsificante Tween 20 (monolaurato de polioxietileno 20 sorbitano), utilizado visando à solubilização dos óleos essenciais, estimulou a germinação de conídios *C. gloeosporioides* (99,83%) e de *C. musae* (100%), visto que, no controle em água destilada e esterilizada, as porcentagens de germinação apresentaram-se reduzidas para 68,83% e 74,17%, respectivamente. Em *C. gloeosporioides* e *C. Musae*, observou-se a formação de apressórios em 67,17% e 81% do total de conídios germinados no controle Tween 20, respectivamente.

Considerando-se que os conídios nos acérvulos encontram-se envolvidos por uma matriz mucilaginosa constituída de polissacarídeos e proteínas solúveis em água (PERFECT et al., 1990; SELA-BUURLAGE; EPSTEIN; RODRIGUEZ, 1991), que os protegem da dessecação aumentando a eficiência de germinação e penetração no tecido do hospedeiro (PERFECT et al., 1990), o estímulo de germinação em presença de Tween 20 pode ser explicado pela capacidade deste de solubilizar proteínas da membrana (ROCHE, 2010). Também Inoue et al. (1996) observaram que a germinação de *Colletotrichum fragariae* ocorreu após a lavagem repetida dos conídios, devido à eliminação de

substâncias inibidoras da germinação produzidas pelo próprio patógeno em altas populações. Assim, pode-se inferir que o Tween 20 promoveu a dispersão dos conídios, impedindo a produção das substâncias inibidoras.

Os óleos essenciais demonstraram eficiência, inibindo a formação de apressórios de *C. gloeosporioides* e *C. musae*. Considerando-se o total de conídios germinados nos tratamentos com os óleos essenciais a 0,2 mL.L⁻¹, 1,0 mL.L⁻¹ e 5,0 mL.L⁻¹, *in vitro*, observou-se que apenas o óleo essencial de tuia-áurea a 0,5% (5.000 µL.L⁻¹) inibiu totalmente a formação de apressórios de *C. musae*. A maioria dos óleos essenciais demonstrou efeito inibidor superior a 50% sobre a formação de apressórios de *C. gloeosporioides* e *C. musae*. A formação de apressórios em *C. gloeosporioides* apresentou-se reduzida em 90,99% com eucalipto (*Eucalyptus globulus*) a 0,5% (5000 µL.L⁻¹) e 90,64% com camomila a 0,1% (1000 µL.L⁻¹). O óleo essencial de cidrão inibiu a formação de apressório de *C. musae* em 98,79%. Nos tratamentos com o óleo essencial de alecrim, laranja-doce e limão-siciliano a inibição da formação de apressórios não se apresentou relacionada ao aumento das concentrações (Tabela 3).

A atividade fungitóxica dos óleos essenciais sobre *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum musae* sobre crescimento micelial e germinação nas fases de vapor ou contato, observada neste trabalho, corrobora os resultados obtidos por alguns autores em outros patossistemas, apresentados a seguir.

Ranasinghe, Jayawardena e Abeywickrama (2002) verificaram que óleos essenciais de *Cinnamomum zeylanicum* (L.) e *Syzygium aromaticum* (L.) (cravo) apresentaram efeito fungicida sobre crescimento micelial de *C. musae*, agente etiológico da antracnose e da podridão-da-coroa em banana e *Lasiodiplodia theobromae* e *Fusarium proliferatum*, agentes etiológicos da podridão-da-coroa, no intervalo de 0,03% a 0,11% (v/v), demonstrando maior eficiência que o

fungicida benomil (0,7-1,2% v/v), *in vitro*.

Tabela 3 Inibição na formação de apressórios (%) em conídios de *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum musae* tratados com óleos essenciais a 0,2 mL.L⁻¹, 1 mL.L⁻¹ e 5 mL.L⁻¹, *in vitro*.

Tratamentos	<i>Colletotrichum musae</i>			<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>		
	0,2 mL.L ⁻¹	1 mL.L ⁻¹	5 mL.L ⁻¹	0,2 mL.L ⁻¹	1 mL.L ⁻¹	5 mL.L ⁻¹
<i>B. dracunculifolia</i>	*	*	*	42,03	58,28	75,52
<i>O. basilicum</i>	44,85	66,85	x	61,71	59,51	x
<i>P. anisum</i>	x	x	x	63,92	33,10	x
<i>C. martinii</i>	69,44	x	x	76,53	x	x
<i>M. arvensis</i>	x	x	x	50,61	50,43	x
<i>R. officinalis</i>	74,12	28,79	88,26	72,51	52,71	50,76
<i>E. citriodora</i>	43,59	8,98	x	41,78	49,06	54,90
<i>E. globulus</i>	42,53	4,04	16,52	25,14	20,75	90,99
<i>M. alternifolia</i>	63,44	27,10	x	39,04	33,45	48,02
<i>M. recutita</i>	53,66	x	x	55,60	90,64	x
<i>C. sinensis</i>	71,83	23,20	x	64,67	24,91	48,92
<i>L. citriodora</i>	45,28	35,24	98,79	42,58	34,96	41,77
<i>E. caryophyllata</i>	78,10	x	x	64,03	x	x
<i>Z. officinale</i>	59,30	x	x	34,35	37,57	57,00
<i>C. limon</i>	75,80	22,50	82,61	48,87	26,68	48,77
<i>T. vulgaris</i>	49,29	x	x	47,68	x	x
<i>C. verbenacea</i>	70,28	97,44	x	56,99	41,82	x
<i>C. citratus</i>	x	x	x	28,16	x	x
<i>L. nobilis</i>	59,01	99,12	x	33,80	40,47	x
<i>O. vulgare</i>	54,66	x	x	44,83	58,28	x
<i>Cinnamomum</i> sp.	x	x	x	x	x	x
<i>O. selloi</i>	31,61	18,79	x	38,62	22,92	47,53
<i>L. officinalis</i>	43,79	63,37	x	41,87	43,71	72,38
<i>C. psifera</i>	25,33	12,50	58,75	38,25	27,83	47,89
<i>C. plumosa</i>	40,53	39,20	100,00	44,74	26,67	36,17
Testemunha (água)	-	-	64,49	-	-	36,56
Testemunha (Tween80)	-	-	19,00	-	-	32,89

*- Tratamento não realizado; x - Inibição total de germinação

Plotto, Roberts e Roberts (2003) verificaram inibição total de *Botrytis cinerea* e *Alternaria arborescens* pelos vapores dos óleos de tomilho, orégano e capim-limão e, ainda, de *Rhizopus stolonifer*, pelos vapores dos óleos de tomilho e orégano.

Edris e Farrag (2003) observaram que os vapores dos óleos essenciais de hortelã-pimenta (*Mentha piperita*) e manjeriço (*Ocimum basilicum*) e seus principais componentes, mentol e mentona, e linalol e eugenol, respectivamente, separadamente e misturados em diferentes proporções, inibiram de maneira dose-dependente o crescimento dos fungos *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizopus stolonifer* e *Mucor* sp., que causam deterioração e grandes perdas de pêssegos em pós-colheita.

Tripathi et al. (2004) verificaram atividade fungitóxica dos óleos essenciais de *Mentha arvensis*, *Ocimum canum* e *Zingiber officinale* contra *Penicillium italicum*, agente etiológico do mofo-azul em laranjas e em limões, *in vitro*. Soyly, Soyly e Kurt (2006) constataram a atividade antifúngica das fases voláteis dos óleos essenciais de orégano (*Origanum syriacum* var. *Bevanii*) e tomilho (*Thymbra spicata* subsp. *spicata*); funcho (*Foeniculum vulgare*), alecrim (*Rosmarinus officinalis*), alfazema (*Lavandula stoechas* subsp. *stoechas*) e louro (*Laurus nobilis*), mediante inibição total do crescimento micelial de *Phytophthora infestans*. Inibição total também observada nas fases de contato dos óleos essenciais de orégano, tomilho e funcho, e de alecrim, alfazema e louro. O potencial fungitóxico do óleo essencial de *Citrus sinensis*, que inibiu totalmente *C. musae*, foi demonstrado também por Sharma e Tripathi (2006) sobre germinação e crescimento micelial dos patógenos pós-colheita *Aspergillus niger* e *Botryodiplodia theobromae* isolados de manga; *Alternaria alternata*, *Cladosporium fulvum* e *Botrytis cinérea*, de tomate; *Penicillium expansum* e *Alternaria mali*, de maçã; *Penicillium chrysogenum* e *Cladosporium cladosporioides*, de uvas e *Myrothecium roridum*, de melão-de-são-caetano.

Azizi et al. (2008), avaliando a atividade antifúngica dos óleos essenciais na fase de vapor de *Thymus vulgaris*, *Mentha piperita*, *Satureja hortensis*, *Cuminum cyminum* e *Trachyspermum copticum* sobre *Penicillium italicum*, *P. digitatum* e *Alternaria citri*, importantes fungos pós-colheita em citrus, verificaram inibição total do crescimento micelial, em diferentes concentrações. Na fase de contato, o crescimento radial de *P. digitatum* foi completamente inibido por *T. vulgaris*, *T. copticum* e *S. hortensis* e apenas reduzido pelos óleos essenciais de *C. cuminum* e *M. piperita*. A inibição total de *A. citri* foi verificada na presença de *T. vulgaris*, *T. copticum*, *S. hortensis* e *C. Cuminum*.

Tzortzakis e Economakis (2007) observaram redução significativa no desenvolvimento das colônias de *Colletotrichum coccodes*, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium herbarum*, *Rhizopus stolonifer* e *Aspergillus niger*, entre 25 e 500 ppm; inibição completa de esporulação a 500 ppm e reduzida até 70% a 25 ppm, em comparação ao controle, na presença do vapor do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* L.), *in vitro*.

Lee et al. (2007) verificaram, em presença do vapor do óleo essencial de *Origanum vulgare*, a inibição do crescimento micelial de *Botrytis cinerea* e *Colletotrichum gloeosporioides*, fungos patogênicos em pós-colheita e de *Fusarium oxysporum*, *Pythium ultimum* e *Rhizoctonia solani*, fungos patogênicos de solo. Observaram, ainda, os vapores de *Thymus vulgaris* inibindo o crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum* e *Rhizoctonia solani* e *Cymbopogon citratus* apenas de *Fusarium oxysporum*. *Eucalyptus citriodora* apenas não inibiu o crescimento de *Colletotrichum gloeosporioides*, confirmando a inatividade verificada neste trabalho.

Barrera-Necha et al. (2008) verificaram a eficiência dos óleos de *Cinnamomum zeylanicum* e *Syzygium aromaticum*, a 50, 100, 150, 200 e 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ sobre a germinação de esporos de *Colletotrichum gloeosporioides*

isolado de mamão (*Carica papaya* L.), com inibição superior a 98%. O crescimento micelial foi totalmente inibido por *Thymus vulgaris* a partir de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e *Cinnamomum zeylanicum* e *Syzygium aromaticum* apresentaram efeito dose dependente. *Eucalyptus globulus* não demonstrou atividade antifúngica nas diferentes concentrações, concordando com os resultados obtidos neste trabalho.

Amiri et al. (2008) verificaram que o crescimento micelial de *Phlyctema vagabunda*, *Penicillium expansum*, *Botrytis cinerea* e *Monilinia fructigena*, importantes patógenos em pós-colheita de frutos de maçã, foi completamente inibido na presença do volátil eugenol a 150 $\mu\text{L.L}^{-1}$ em 4 °C ou 20°C. Sukatta et al. (2008), pelo método da placa de Petri invertida, verificaram a atividade antifúngica dos óleos de cravo e canela contra *Aspergillus niger*, *Alternaria alternata*, *C. gloeosporioides*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Phomopsis viticola* e *Rhizopus stolonifer*, patógenos pós-colheita que causam a deterioração das uvas.

Rozwalka et al. (2008) observaram inibição total do crescimento micelial de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides* isolados de goiabas, na presença dos vapores do óleo essencial de cravo-da-índia. O óleo de capim-limão (*Cymbopogon citratus*) apresentou ação fungitóxica sobre *C. gloeosporioides* e, sobre *G. cingulata*, ação fungistática até o quinto dia.

Tripathi e Shukla (2009) comprovaram a atividade antifúngica dos óleos essenciais de gerânio, hortelã, palmarosa e tomilho, pela inibição total de *Botryodiplodia theobromae*, agente etiológico da podridão peduncular de frutos de manga.

Tzortzakis (2009) observou redução no desenvolvimento das colônias de *Colletotrichum coccodes*, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium herbarum*, *Rhizopus stolonifer* e *Aspergillus niger*, na presença do vapor do óleo essencial de canela (*Cinnamomum zeylanicum* L.), *in vitro*.

Souza Júnior et al. (2009), avaliando o efeito fungitóxico de óleos essenciais sobre *C. gloeosporioides*, isolado do maracujazeiro-amarelo,

verificaram que os óleos essenciais de *Lippia sidoides*, *Ocimum gratissimum*, *Lippia citriodora*, *Cymbopogon citratus* e *Psidium guayava* var. *pomifera*, incorporados em meio ágar-água e BDA (batata, dextrose e ágar), a partir da concentração de $1 \mu\text{L.mL}^{-1}$, inibiram totalmente a germinação dos conídios. Observaram também a inibição total do crescimento micelial pelos óleos de *Lippia sidoides*, *Ocimum gratissimum*, *Lippia citriodora* e *Cymbopogon citratus*.

Corato et al. (2010), avaliando a atividade antifúngica do óleo de *Laurus nobilis* (louro), verificaram inibição total do crescimento micelial de *Monilinia laxa* a 200 mg.mL^{-1} e de *Botrytis cinerea* a 1.000 mg.L^{-1} e ação fungistática em ambos os casos.

3.3 Identificação da composição química de óleos essenciais - Perfil cromatográfico de óleos essenciais

Mediante comparação dos índices de similaridade de espectro de massa observados, referentes às áreas relativas em porcentagem, com os dados disponíveis na biblioteca Wiley 8 do próprio cromatógrafo GCMS-QP2010 Plus (Shimadzu), foram identificados 70 compostos em 25 óleos essenciais.

Os óleos essenciais e seus compostos foram agrupados em função da potencial antifúngico observado no item 3.2. Assim, nas Tabelas 4, 5 e 6, encontram-se os óleos que não apresentaram atividade fungitóxica sobre *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum musae*, os óleos que inibiram ambos e os que inibiram apenas *Colletotrichum musae*, respectivamente.

Os resultados obtidos de área (%) por meio da cromatografia em fase gasosa e espectrometria de massas foram aplicados à técnica de agrupamento hierárquico, que agrupou os óleos essenciais de acordo com a similaridade de compostos, produzindo um dendrograma (Figura 5).

Tabela 4 Composição de óleos essenciais que não apresentaram atividade fungitóxica sobre *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum musae* identificada em cromatógrafo a gás acoplado a detector de massas (GCMS-QP2010 Plus, Shimadzu), mediante comparação dos índices de similaridade de espectro de massa, referentes às áreas relativas (%), com os dados disponíveis na biblioteca Wiley 8 do próprio cromatógrafo.

Óleos essenciais	<i>Baccharis dracunculifolia</i>	<i>Lippia citriodora</i>	<i>Chamaecyparis psifera</i>	<i>Rosmarinus officinalis</i>	<i>Chamaecyparis plumosa</i>	<i>Eucalyptus globulus</i>	<i>Eucalyptus citriodora</i>	<i>Citrus limon</i>
aromadendreno*	-	19,42	-	-	-	-	-	-
biciclogermacreno	13,80	-	-	-	-	-	-	-
bornil acetato*	-	-	-	-	39,93	-	-	-
δ -cadineno*	4,95	-	-	-	-	-	-	-
Cânfora	-	-	-	41,28	-	-	-	-
δ -3-careno	-	-	-	-	15,80	-	-	-
β -cariofileno*	8,98	-	-	-	-	-	-	-
ρ -cimeno*	-	-	-	-	-	2,29	3,33	-
Eucalyptol	-	-	-	10,63	-	84,49	58,04	-
germacreno D	8,26	-	-	-	-	-	-	-
α -humuleno*	2,01	-	-	-	-	-	-	-
limoneno*	9,42	-	-	11,55	5,86	7,26	6,48	83,38
linalol*	-	-	-	-	-	-	-	-
α -muuroleno	0,99	-	-	-	-	-	-	-
Mirceno	-	-	6,71	5,66	13,93	-	-	-
nerolidol*	14,77	-	-	-	-	-	-	-
α -felandreno	-	-	-	-	-	0,50	4,31	-
α -pineno*	1,94	-	23,65	11,87	20,33	4,78	27,84	-
β -pineno*	6,68	-	-	-	-	-	-	7,68
Sabineno	-	0,95	-	-	-	-	-	-
Espatulenol	14,98	-	-	-	-	-	-	-
γ -terpineno*	-	-	-	-	-	0,68	-	8,94
α -terpineol*	-	-	-	-	2,05	-	-	-
não identificados	13,22	79,63	69,64	19,01	2,10	-	-	-

*Compostos encontrados em cascas de frutos maduros de goiabeiras (*Psidium guajava* L.) de diferentes variedades.

“Tabela 5, conclusão”

Compostos	Óleos essenciais											
	<i>Eugenia caryophyllata</i>	<i>Pimpinella anisum</i>	<i>Matricaria recutita</i>	<i>Mentha arvensis</i>	<i>Cordia verbenacea</i>	<i>Origanum vulgare</i>	<i>Thymus vulgaris</i>	<i>Laurus nobilis</i>	<i>Cymbopogon citratus</i>	<i>Cymbopogon martinii</i>	<i>Ocimum basilicum</i>	<i>Cinnamomum</i> sp.
α ,-epi-muurolol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,55	-
neomentol	-	-	-	52,56	-	-	-	-	-	-	-	-
neral	-	-	-	-	-	-	-	-	38,50	5,71	-	-
neril acetato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,65	-	-
<i>trans</i> -, β -ocimeno	-	-	-	-	-	5,80	-	-	-	-	-	-
α -pineno *	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,54
β -pineno*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,10
pulegona	-	-	-	1,72	68,96	-	-	-	-	-	-	-
<i>trans</i> -hidrato de sabineno	-	-	-	-	-	12,96	-	-	-	-	-	-
sabineno	-	-	-	-	-	2,28	0,95	6,69	-	-	-	-
4-terpinenol*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,28
α -terpineno*	-	-	-	-	-	1,15	-	-	-	-	-	-
α -terpineol *	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,15	1,04
α -terpinil acetato	-	-	-	-	-	-	-	17,34	-	-	-	-
timol	-	-	-	1,32	-	11,46	33,72	-	-	-	-	-
não identificados	6,55	-	29,16	4,65	16,87	54,14	60,26	67,92	-	-	8,03	0,70

*Compostos encontrados em cascas de frutos maduros de goiabeiras (*Psidium guajava* L.) de diferentes variedades.

^a *para-alil*-anisol (1-metóxi, 4-(1-propenil)-benzeno)

^b *para-alil*-anisol (1-metóxi, 4-(2-propenil)-benzeno)

Tabela 6 Composição de óleos essenciais que apresentaram atividade fungitóxica apenas sobre e *Colletotrichum musae* identificada em cromatógrafo a gás acoplado a detector de massas (GCMS-QP2010 Plus, Shimadzu), mediante comparação dos índices de similaridade de espectro de massa, referentes às áreas relativas (%), com os dados disponíveis na biblioteca Wiley 8 do próprio cromatógrafo.

Compostos	Óleos essenciais				
	<i>Ocimum selloi</i>	<i>Zingiber officinale</i>	<i>Lavandula officinalis</i>	<i>Melaleuca alternifolia</i>	<i>Citrus sinensis</i>
<i>para-alil</i> -anisol ^a	96,75	-	-	-	-
biciclogermacreno	1,24	-	-	-	-
cânfora	-	-	2,12	-	-
α -curcumeno	-	3,77	-	-	-
ρ -cimeno*	-	-	-	2,24	-
eucaliptol	-	7,00	62,11	38,19	-
<i>trans</i> -, β -farneseno	-	10,33	-	-	-
<i>trans,trans</i> - α -farneseno	-	10,22	-	-	-
fenchona	-	-	1,17	-	-
geranial	-	6,80	-	-	-
germacreno B	-	10,04	-	-	-
limoneno*	-	-	-	4,63	10,00
linalol*	-	-	3,23	-	-
mirtenol	-	-	5,27	-	-
neral	-	3,31	-	-	-
α -pineno*	-	-	3,22	1,59	-
β -pineno*	-	-	10,79	-	-
<i>trans</i> -pinocarveol	-	-	4,71	-	-
pinocarvona	-	-	1,43	-	-
β -sesquifelandreno	-	7,15	-	-	-
4-terpinenol*	-	-	0,64	31,74	-
γ -terpineno*	-	-	-	10,25	-
α -terpineol*	-	-	1,91	6,36	-
terpinolene	-	-	-	1,41	-
α -zingibereno	-	21,86	-	-	-
não identificados	2,01	19,52	3,40	3,59	-

^a *para-alil*-anisol (1-metóxi, 4-(1-propenil)-benzeno)

*Compostos encontrados em cascas de frutos maduros de goiabeiras (*Psidium guajava* L.) de diferentes variedades.

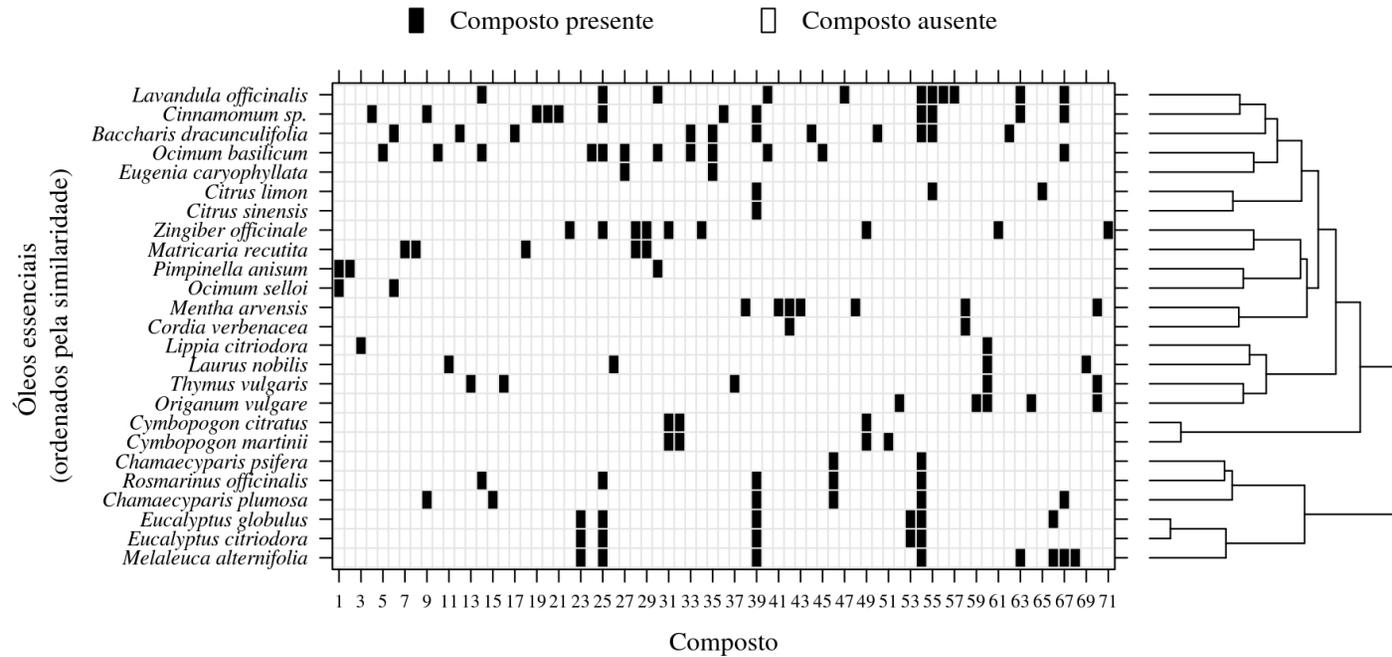


Figura 5 Dendrograma de similaridade de óleos essenciais, obtido da análise de agrupamento hierárquico, com base na ausência e na presença dos compostos (binário 0 e 1).

Os dendrogramas são especialmente úteis na visualização de semelhanças de variáveis escolhidas entre amostras ou objetos agrupados entre si, representados por pontos em espaço com dimensão maior do que três, em que a representação de gráficos convencionais não é possível. A análise de componentes principais e a de agrupamento hierárquico são técnicas complementares de estatística multivariada que têm grande aceitação na análise de dados químicos (MOITA NETO; MOITA, 1998).

Diante da complexidade dos óleos essenciais, a atribuição de potencial fungitóxico a um ou mais compostos constitui uma tarefa muito complicada.

Importante ressaltar que o potencial fungitóxico dos óleos essenciais pode ser expresso pelo sinergismo entre seus componentes (TRIPATHI; DUBEY, 2004) ou por um composto isoladamente, bem como por suas concentrações.

Dessa forma, inicialmente, apenas algumas inferências sobre o potencial fungitóxico dos óleos essenciais e seus compostos foram elaboradas, com base nos resultados obtidos pelos agrupamentos, em função da atividade antifúngica e similaridade de compostos apresentados.

Os compostos similares que permitiram o agrupamento dos óleos produzindo o dendrograma foram o biciclogermacreno em atroveran e em alecrim-do-campo; α -humuleno em alecrim-do-campo e em cravo-da-índia; *para-alil*-anisol (1-metóxi, 4-(1-propenil)-benzeno) em atroveran e em erva-doce; *trans*- β -farneseno e *trans,trans*- α -farneseno, em camomila e gengibre; mentona e pulegona em menta e em erva-baleeira; sabineno e timol em orégano e tomilho; sabineno em louro e cidrão; geranial, geraniol e neral em capim-limão e palmarosa; eucaliptol, fenchona, linalol e α -terpineol em manjerição e alfazema; eucaliptol, limoneno, α -pineno, 4-terpinenol e α -terpineol em canela e melaleuca; mirceno e α -pineno em tuia-europa, alecrim e tuia-áurea; limoneno em alecrim e tuia-áurea; ρ -cimeno, eucaliptol, limoneno, α -felandreno e α -

pineno em eucaliptos (*Eucalyptus globulus* e *Eucalyptus citriodora*) e limoneno em limão-siciliano e laranja-doce.

Pelo agrupamento dos óleos essenciais, em função da atividade antifúngica, observou-se que os compostos aromadendreno, biciclogermacreno, bornil acetato, δ -cadineno, cânfora, δ -3-careno, β -cariofileno, ρ -cimeno, eucaliptol, germacreno D, α -humuleno, limoneno, α -muuroleno, mirceno, nerolidol, α -felandreno, α -pineno, β -pineno, sabineno, espatulenol, γ -terpineno e α -terpineol não apresentaram efeito fungitóxico sobre *C. gloeosporioides* e *C. musae*.

Importante observar que alguns compostos verificados nos óleos essenciais encontram-se na composição da casca de goiabas maduras que, normalmente, nessa fase, apresentam lesões de *C. gloeosporioides*. Infere-se, então, que esses não possuem propriedade fungitóxica. Dentre os compostos verificados na composição da casca de frutos maduros de goiabeiras (*Psidium guajava* L.) por Chen, Sheu e Wu (2006), na cultivar Chung-Shan-Yueh-Pa, foram encontrados α -pineno, β -pineno, benzaldeído, canfeno, α -terpineno, ρ -cimeno, limoneno, γ -terpineno, linalol, 4-terpinenol, α -terpineol, bornil acetato, α -copaeno, β -cariofileno, aromadendreno, α -humuleno, δ -cadineno e nerolidol. Soares et al. (2007), na cultivar Cortibel (goiaba branca), encontraram limoneno e α -humuleno.

Os compostos presentes nos óleos essenciais que não apresentaram fungitoxicidade foram eliminados do grupo que promoveu a inibição total, restando como possíveis inibidores de *C. gloeosporioides* e *C. musae*: *para-alil-anisol* (1-metóxi, 4-(1-propenil)-benzeno), *para-alil-anisol* (1-metóxi, 4-(2-propenil)-benzeno) e fenchona (erva-doce), óxido de α -bisabolol A, óxido de α -bisabolol B, camazuleno, *trans*-, β -farneseno e *trans,trans*-, α -farneseno (camomila), isopulegol, mentol, mentona, mentil acetato, neomentol, pulegona e timol (menta), mentona e pulegona (erva-baleeira), carvacrol, *trans*-, β -ocimene,

trans-hidrato de sabineno, α -terpineno e timol (orégano), canfeno, isoborneol e timol (tomilho), butilato de hidroxitolueno, metileugenol e α -terpinil acetato (louro), geranial, geraniol, neral (capim-limão), geranial, geraniol, neral e neril acetato (palmarosa), α -*trans*-bergamoteno, α -bulneseno, β -elemeno, eugenol; fenchona, α ,*epi*-muurolol e linalol (manjeriçã), benzaldeído, *trans*-cinamalaldeído, acetato de cinamila, α -copaeno, hidrocinalaldeído, 4-terpinenol e α -terpineol (canela) (Figura 6); e, de *C. musae*: α -curcumeno, germacreno B, mirtenol, *trans*-pinocarveol, pinocarvone β -sesquifelandreno, terpinolene e α -zingibereno (Figura 7).

Trabalhos referentes à eficiência de compostos na inibição e/ou controle de *C. gloeosporioides* e *C. musae*, *in vitro* ou *in vivo*, praticamente inexistem. Porém, em alguns estudos tem sido relatada a utilização desses no controle de patógenos em outros patossistemas, corroborando os resultados obtidos.

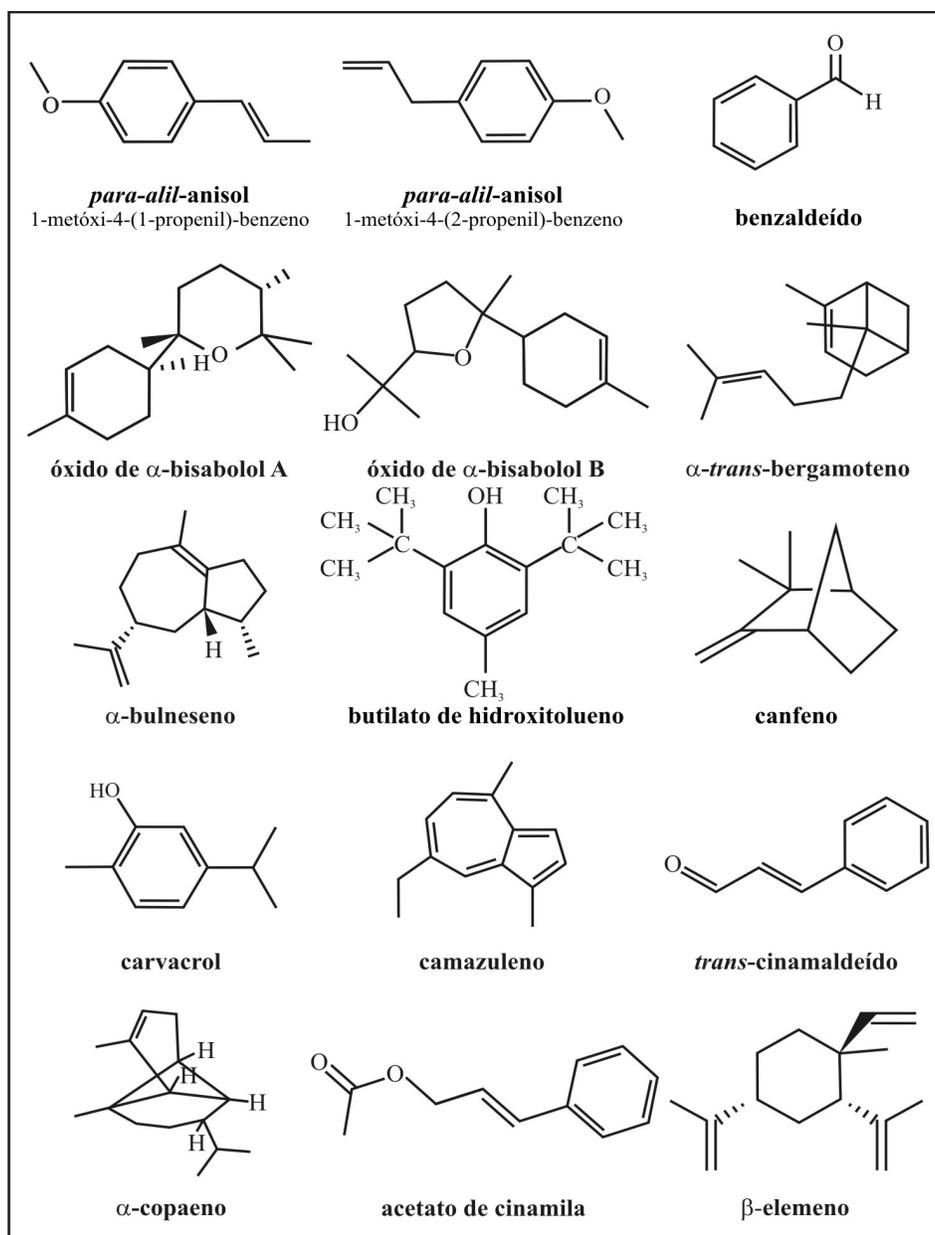
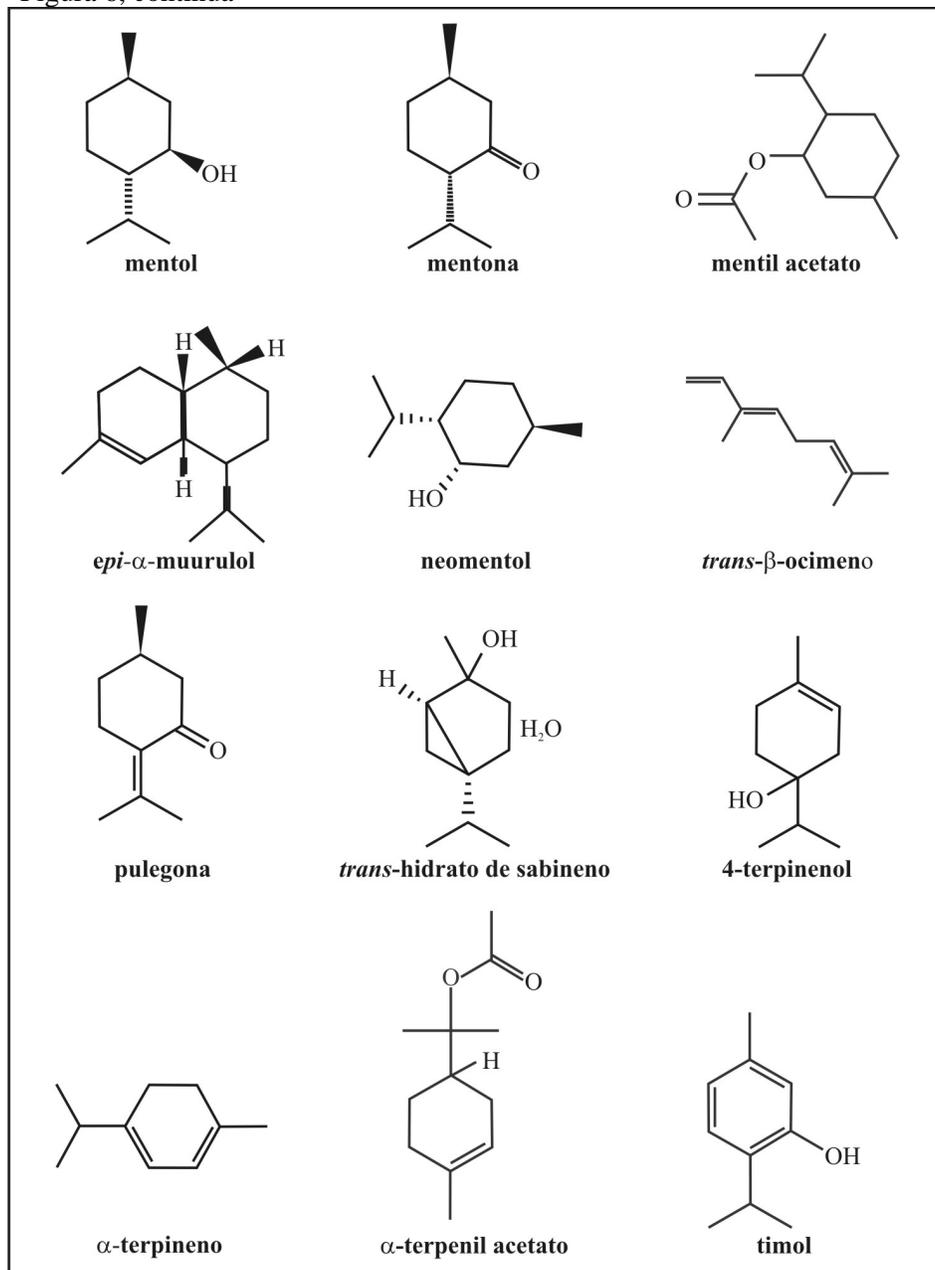
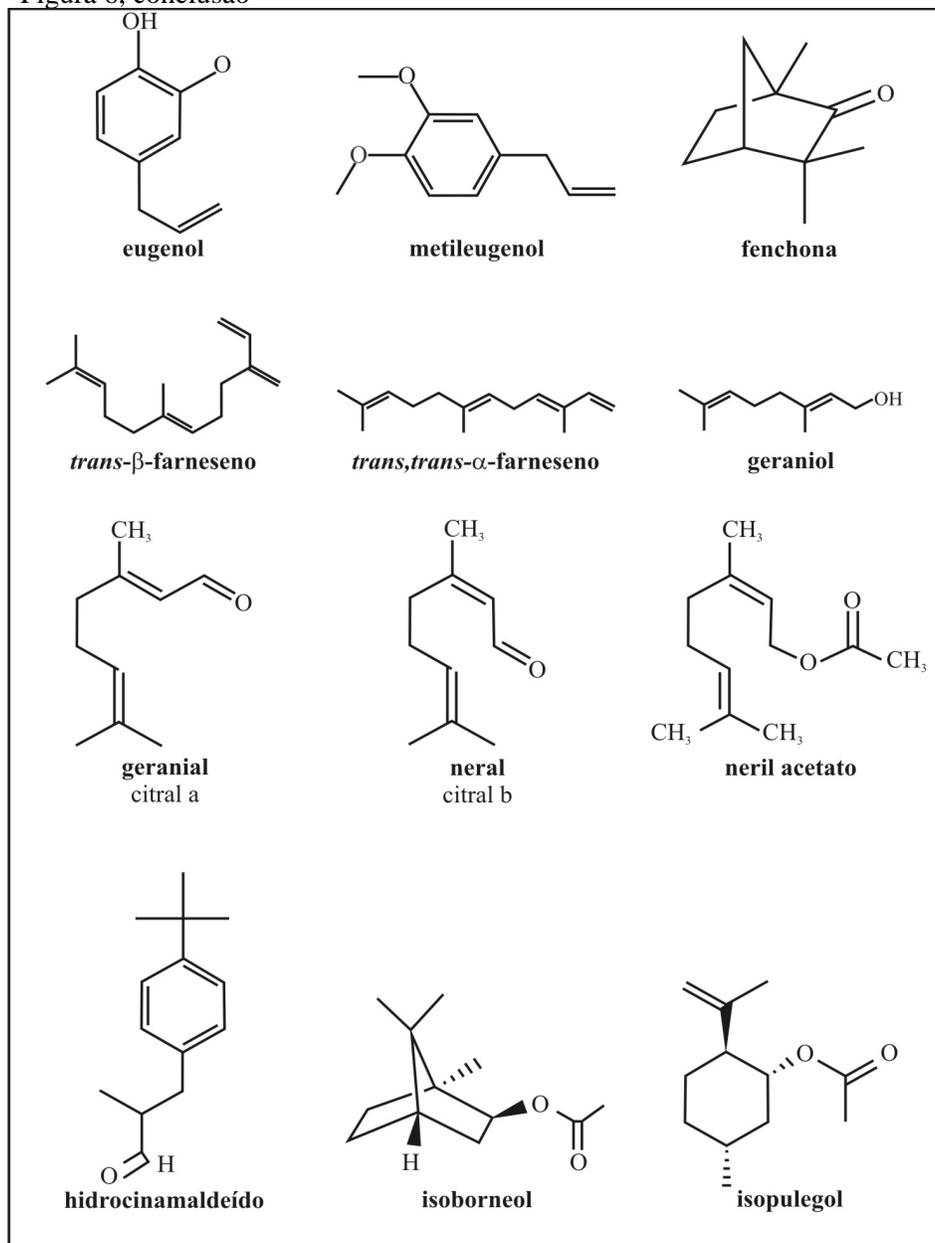


Figura 6 Estruturas dos compostos de óleos essenciais que apresentaram fungitoxicidade promovendo a inibição total da germinação de *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum musae*.

“Figura 6, continua”



“Figura 6, conclusão”



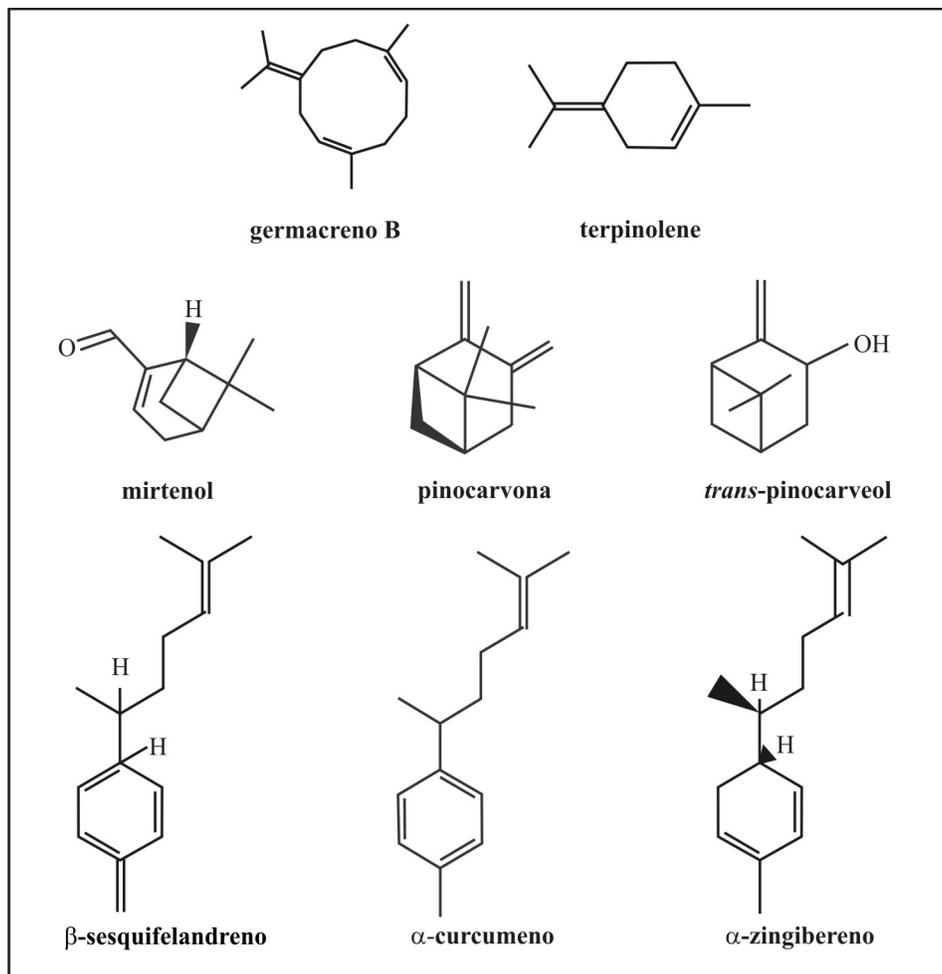


Figura 7 Estruturas dos compostos de óleos essenciais que apresentaram fungitoxicidade promovendo a inibição total da germinação de *Colletotrichum musae*:

Chu, Liu e Zhou (2001) observaram redução significativa de *Monilinia fructicola* (podridão parda) de 21% para 12%, em cerejas 'Hedelfingen' (*Prunus avium* L.) inoculadas e fumigadas com timol antes do armazenamento a frio

(10°C), mas nenhum efeito sobre *Penicillium expansum* (mofo-azul).

A inibição total de *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum musae* foi observada na presença dos óleos essenciais de *Mentha arvensis* (menta), *Ocimum basilicum* (manjeriço), *Cymbopogon citratus* (capim-limão) e *Cymbopogon martinii* (palmarosa) que, em suas composições, apresentaram mentol, linalol e geraniol, respectivamente, corroborando os resultados obtidos por Singh et al. (2002). Estes autores observaram a inibição total do crescimento micelial dos fungos patogênicos da cana *Curvularia pallescens* na presença de mentol e linalol e de *Colletotrichum falcatum* pelo geraniol.

Salgado et al. (2004) atribuíram maior atividade fungitóxica ao óleo essencial de *Eucalyptus urophylla* (500 mg/kg) sobre o crescimento micelial dos fitopatógenos *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* e *Bipolaris sorokiniana* na presença do composto denominado globulol, ausente em *E. camaldulensis* e *E. citriodora*. Possivelmente, *Eucalyptus citriodora* e *Eucalyptus globulus*, utilizados neste trabalho, não apresentaram efeito fungitóxico sobre *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum musae*, também devido à ausência de globulol.

O efeito inibitório demonstrado pelo óleo essencial de louro sobre *C. musae* na fase volátil e sobre *C. gloeosporioides* e *C. musae* também foi encontrado por Soylu, Soylu e Kurt (2006) na inibição total do crescimento micelial e na produção de esporângios de *Phytophthora infestans*. Os autores verificaram, ainda, a atividade antifúngica do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* (alecrim) sobre *Phytophthora infestans*, resultado esse não observado sobre *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum musae*. Diferenças foram verificadas na composição dos óleos essenciais utilizados por Soylu, Soylu e Kurt (2006) e nos do presente trabalho, tendo sido encontrados, no óleo de *Laurus nobilis*, os compostos 1,8-cineol (35,5%), sabineno (15,0%), α -terpinil acetato (14,2%) e α -pineno (7,5%) e butilato de hidroxitolueno, metileugenol e

α -terpinil acetato; no óleo de *Rosmarinus officinalis* (alecrim), foram encontrados borneol (20,4%), cânfora (19,5%), 1,8-cineol (17,4%), linalol (6,1%) e cânfora (41,28%) eucaliptol, limoneno, mircenol e α -pineno, respectivamente. Dan et al. (2010) verificaram que o óleo essencial de *Asarum heterotropoides* var. *mandshuricum* e o metileugenol (59,42%), seu componente mais abundante, inibiram totalmente o crescimento micelial de *Alternaria humicola*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Rhizoctonia solani* e *Phytophthora cactorum*, exceto de *Fusarium solani*.

Lee et al. (2007) verificaram que o óleo essencial de *Origanum vulgare* inibiu o crescimento micelial dos fungos patogênicos em pós-colheita *Botrytis cinerea* e *Colletotrichum gloeosporioides* e de solo *Fusarium oxysporum*, *Pythium ultimum* e *Rhizoctonia solani*. Os óleos de *Cuminum cyminum* e *Eucalyptus citriodora* apenas não inibiram *Colletotrichum gloeosporioides*. *Thymus vulgaris* suprimiu o crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum* e *Rhizoctonia solani* e *Cymbopogon citratus* apenas de *Fusarium oxysporum*. Resultado semelhante foi observado sobre *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum musae* inibidos pelos óleos de *Origanum vulgare* e *Thymus vulgaris*, enquanto *Eucalyptus citriodora* não apresentou efeito inibitório. Embora tenham os óleos apresentado composições químicas diferentes, foram observados compostos comuns, como o geraniol e o neral em *C. citratus*, carvacrol e timol em *O. vulgare* e timol em *T. vulgaris*.

Na presença dos óleos essenciais de orégano contendo carvacrol, capim-limão e palmarosa contendo citral, observou-se a inibição total sobre os patógenos. Esse resultado corrobora o relatado encontrado por Neri et al. (2007) que verificaram, na fase de vapor, a maior atividade fungicida de *trans*-2-hexenal, carvacrol e citral sobre a germinação de conídios e crescimento micelial de *Monilinia laxa*, agente etiológico da podridão parda em frutos de caroço, in

vitro.

O citral constitui-se da mistura isomérica de geranial ((2E)-3,7-dimetilocta-2,6-dienal, citral A ou isômero E) e neral ((2Z)-3,7-dimetilocta-2,6-dienal, citral B ou isômero Z) (GUIMARÃES et al., 2008).

Na composição dos óleos essenciais de atroveran, gengibre, alfazema, melaleuca e laranja-doce, que apresentaram efeito inibitório apenas sobre *C. musae*, foram observados os compostos *para-alil-anisol* (1-metóxi, 4-(1-propenil)-benzeno), α -curcumeno, *trans*-, β -farneseno, *trans,trans*- α -farneseno, fenchona, geranial, germacreno B, mirtenol, neral, *trans*-pinocarveol, pinocarvona, β -sesquifelandreno, 4-terpinenol, terpinolene e α -zingibereno. Observou-se, então, que os compostos *para-alil-anisol* (1-metóxi, 4-(1-propenil)-benzeno), *trans*- β -farneseno, *trans,trans*- α -farneseno, fenchona, geranial, neral e 4-terpinenol foram citados anteriormente como prováveis inibidores de ambos os patógenos, incitando a dúvida sobre o potencial fungitóxico desses sobre *C. gloeosporioides*.

Uma hipótese para explicar a inibição apenas de *C. musae* baseou-se nas quantidades expressas pelas áreas de massa (%) reduzidas dos compostos *trans*-, β -farneseno, fenchona, geranial e neral, em comparação com as quantidades dos óleos que apresentaram inibição sobre *C. gloeosporioides* e *C. musae*. Bhaskara Reddy et al. (1998), após verificarem o controle de *Botrytis cinerea* (73,6% e 75,8%) e *Rhizopus stolonifer* (73,0% e 74,8%) em morangos, na presença de compostos voláteis de *Thymus vulgaris* obtidos dos clones Laval-1 e Laval-2, respectivamente, relacionaram a maior atividade antifúngica de Laval-2 (66,2%) ao conteúdo relativamente mais elevado dos compostos antimicrobianos *p*-cimeno, linalol, 4-terpinenol e timol que em Laval-1 (53,5%), corroborando/comprovando a hipótese formulada.

O potencial fungitóxico do óleo essencial de *Citrus sinensis* que inibiu totalmente *Colletotrichum musae* foi demonstrado também por Sharma e

Tripathi (2006) sobre a germinação e o crescimento micelial dos patógenos pós-colheita *Aspergillus niger* e *Botryodiplodia theobromae* isolados de manga; *Alternaria alternata*, *Cladosporium fulvum* e *Botrytis cinérea*, de tomate; *Penicillium expansum* e *Alternaria Mali*, de maçã; *Penicillium chrysogenum* e *Cladosporium cladosporioides*, de uvas e *Myrothecium roridum*, de melão-de-são-caetano. Entretanto, Sharma e Tripathi (2006) verificaram a presença de α -pineno, β -pineno, myrceno, limoneno (84,2%), linalol, citral, α -terpineol, terpinoleno, citronelal e geraniol na composição do óleo essencial do *Citrus sinensis*, enquanto o utilizado no presente trabalho apresentou-se exclusivamente composto por limoneno (100%).

Com base na composição do óleo essencial de *Citrus sinensis* apresentada, pode-se inferir que, a partir de determinada concentração, o limoneno depende de outros compostos para apresentar potencial fungitóxico. O óleo de limão-siciliano, embora tenha apresentado área de massa 83,38% próxima da encontrada por Sharma e Tripathi (2006), de 84,2%, não apresentou efeito inibitório sobre *C. gloeosporioides* e *C. musae*, provavelmente devido aos demais compostos que fazem parte da sua composição; α -pineno e γ -terpineno não apresentarem ação fungitóxica.

No caso dos compostos *trans,trans*- α -farneseno e 4-terpinenol, que apresentaram áreas de massa (%) maiores, pode-se inferir que, embora presentes nos óleos, eles não apresentam propriedade fungitóxica sobre *C. gloeosporioides*. Entretanto, tal argumento não se aplica para os óleos de atroveran, que inibiram apenas *Colletotrichum musae* e erva-doce, responsável pela inibição de ambos, pois as áreas de massa (%) do *para-alil*-anisol (1-metóxi, 4-(1-propenil)-benzeno) apresentaram-se aproximadas em 96,75% e 97,99%, respectivamente. Na composição de erva-doce, além do *para-alil*-anisol (1-metóxi, 4-(1-propenil)-benzeno) e fenchona, compostos comuns a outros óleos, observou-se a presença de *para-alil*-anisol (1-metóxi, 4-(2-propenil)-

benzeno), que permitiu a formulação da hipótese referente à combinação de compostos e ou o sinergismo ser responsável pelo efeito inibitório. Edris e Farrag (2003) verificaram que a mistura de linalol e eugenol, principais componentes do óleo de manjeriço, que individualmente apresentaram atividade antifúngica moderada e nenhuma atividade sobre *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizopus stolonifer* e *Mucor* sp., respectivamente, quando misturados em proporção semelhante às suas concentrações no óleo original, proporcionaram melhoria nas propriedades antifúngicas, indicando um efeito sinérgico. Na avaliação do óleo essencial de hortelã-pimenta contra os mesmos patógenos, observaram que o mentol apresentou atividade antifúngica aumentada na presença de mentona que, sozinha, não demonstrou nenhum efeito.

A existência dos compostos não identificados não pode ser negligenciada, pois os mesmos podem ter contribuído para a inibição dos patógenos.

Indubitavelmente, o potencial fungitóxico está relacionado com a composição do óleo, bem como com a sensibilidade do patógeno a um ou mais compostos em diferentes quantidades.

Assim, um dos desafios para a pesquisa agrônômica no cultivo de plantas medicinais consiste na obtenção de metabólitos em quantidade e qualidade, isolados ou como fitocomplexos (MING, 1994). A concentração de princípios ativos não se apresenta uniforme durante o ciclo de vida da planta, podendo variar com o hábitat, a colheita e a preparação (TESKE; TRENTINI, 1997). Portanto, necessariamente, os fatores intrínsecos, ambientais e técnicos que influenciam nos mecanismos de síntese pelas plantas e que podem garantir a qualidade do material até o processamento devem ser compreendidos. Os fatores intrínsecos, também chamados de genéticos, atribuem a uma espécie o potencial para elaborar determinados produtos em função da carga genética específica.

Dentre os fatores ambientais abióticos, a disponibilidade de água, nutrientes e a intensidade luminosa interferem na produção de metabólitos secundários e ou princípios ativos. Os fatores ambientais bióticos apresentam relevância na medida em que ocorrem interações planta-microorganismos, planta-planta e planta-herbívoros, levando a planta medicinal a alterar seus mecanismos internos de síntese de metabólitos. Dentre os fatores técnicos que interferem na síntese de compostos estão a época de plantio, a adubação, que determina diferentes composições e teores de princípios ativos, tratos culturais, como amontoa, poda, irrigação e sombreamento, controle de pragas e doenças (resíduos), colheita, secagem e armazenagem (MING, 1994).

A atribuição/confirmação de tal potencial a um ou mais compostos depende da avaliação em cromatografia em fase gasosa das frações antifúngicas determinadas em cromatografia de camada delgada - bioautografia.

3.4 Determinação da fração antifúngica dos óleos essenciais sobre *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum musae* por meio de cromatografia em camada delgada

Os halos de inibição do crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum musae* observados nas bioautografias em cromatografia de camada delgada foram atribuídos às frações ativas com ação antifúngica dos óleos essenciais. Os valores das distâncias percorridas, os comprimentos das bandas (halos de inibição) e os fatores de retenção (Rf) podem ser observados nas Figuras 8 e 9.



Figura 8 Halos de inibição (bandas), representando as frações ativas dos óleos essenciais obtidos em cromatografia de camada delgada-bioautografia, 4 dias após a aplicação do meio de cultura BDA contendo *Colletotrichum gloeosporioides* a 1×10^6 esporos.mL⁻¹, com as respectivas distâncias percorridas e o comprimento das bandas. Fatores de retenção (Rf): A. Controle - Rf 1,00; B. Cravo-da-índia - Rf 0,60; C. Capim-limão - Rf 0,73; D. Orégano - Rf 0,63; E. Louro - Rf 0,51e 0,68; F. Erva-doce - Rf 0,74; G. Manjerição - Rf 0,61 e 0,91; H. Palmarosa - Rf 0,53; I. Tomilho - Rf 0,67; J. Canela - Rf 0,47; K. Camomila - Rf 0,41 e 0,67.

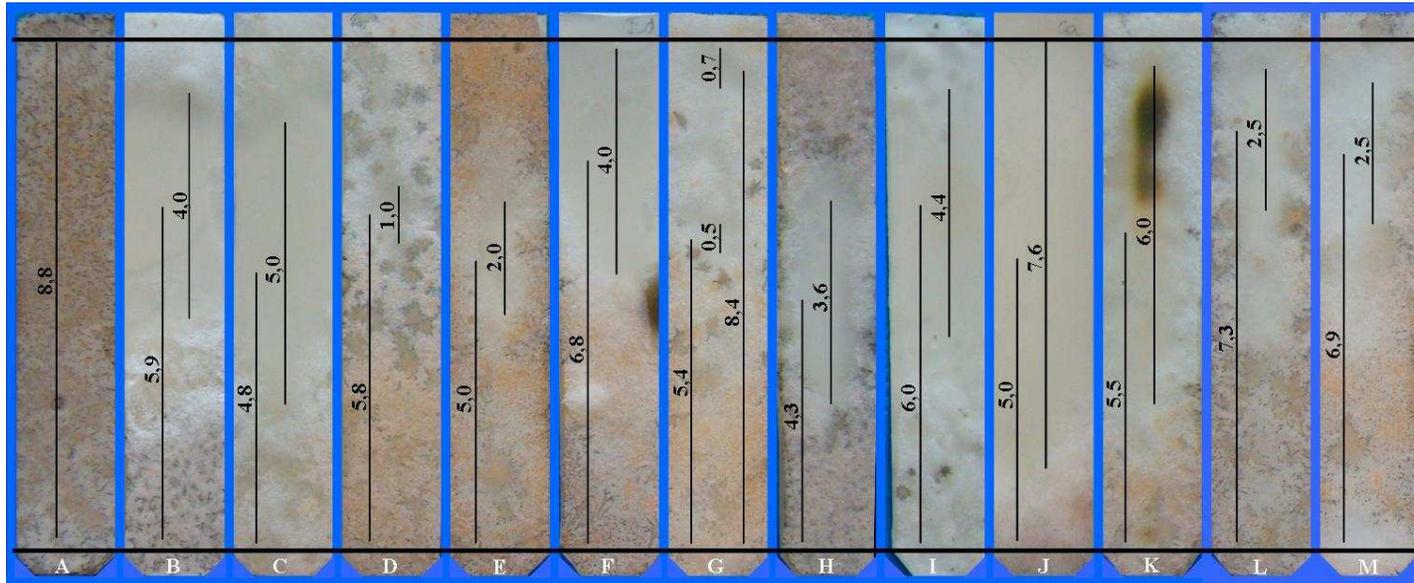


Figura 9 Halos de inibição (bandas), representando as frações ativas dos óleos essenciais obtidos em cromatografia de camada delgada-bioautografia, 5 dias após aplicação do meio de cultura BDA contendo *Colletotrichum musae* a 1×10^6 esporos.mL⁻¹, com respectivas distâncias percorridas e comprimento das bandas. Fatores de retenção (Rf): A. Controle - Rf 1,00; B. Cravo-da-índia - Rf 0,67; C. Capim-limão - Rf 0,55; D. Orégano - Rf 0,66; E. Louro - Rf; F. Erva-doce - Rf 0,77; G. Manjeriçao - Rf 0,61 e 0,95; H. Palmarosa - Rf 0,49; I. Tomilho - Rf 0,68; J. Canela - Rf 0,57; K. Camomila - Rf 0,63; L. Gengibre - Rf 0,83; M. Atroveran - Rf 0,78.

4 CONCLUSÕES

A inibição do crescimento micelial e as taxas de velocidade de crescimento reduzidas observadas na fase de vapor, bem como a inibição de germinação e a redução na formação de apressórios de *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum musae*, na fase de contato, evidenciam que a utilização de óleos essenciais, bem como de seus compostos, constitui uma ferramenta promissora que poderá substituir os fungicidas sintéticos como medida de controle de doenças em pós-colheita, atendendo aos preceitos da agricultura alternativa.

A identificação dos metabólitos secundários com atividade antifúngica, em óleos essenciais, também é uma ferramenta útil, pois permite a síntese de novos produtos pela indústria química.

REFERÊNCIAS

AMIRI, A. et al. *In vitro* and *in vitro* activity of eugenol oil (*Eugenia caryophyllata*) against four important postharvest apple pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 12, n. 1, p. 13-19, Jan. 2008.

AMORIM, L. Infecção. In: AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. cap. 15, p. 295-308.

AZIZI, M. et al. Inhibitory effect of some medicinal plants' essential oils on postharvest fungal disease of citrus fruits. In: INTERNATIONAL HORTICULTURAL CONGRESS, 27., Belgium. **Anais...** Belgium: Acta Horticulturae, 2008. p. 279-286.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils: a review. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 2, p. 446-475, Feb. 2008.

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**, Oxford, v. 7, n. 2, p. 174-178, Mar. 2008.

CHAMEL INDÚSTRIA E COMÉRCIO DE PRODUTOS NATURAIS. **Óleos essenciais**. Campo Largo, 2010. Disponível em: <<http://www.chamel.com.br>>. Acesso em: 30 jan. 2010.

CHEN, H. C.; SHEU, M. J.; WU, C. M. Characterization of volatiles in guava (*Psidium guajava* L. cv. Chung-Shan-Yueh-Pa) fruit from Taiwan. **Journal of Food and Drug Analysis**, Hoboken, v. 14, n. 4, p. 398-402, 2006.

CHU, C.-L.; LIU, W.-T.; ZHOU, T. Fumigation of sweet cherries with timol and acetic acid to reduce postharvest brown rot and blue mold rot. **Fruits**, Paris, v. 56, n. 2, p. 123-130, Mar./Apr. 2001.

CORATO, U. de. et al. Use of essential oil of *Laurus nobilis* obtained by means of a supercritical carbon dioxide technique against post harvest spoilage fungi **Crop Protection**, Guildford, v. 29, n. 2, p. 142-147, Feb. 2010.

DAN, Y. et al. Activities of essential oils from *Asarum heterotropoides* var. *mandshuricum* against five phytopathogens. **Crop Protection**, Guildford, v. 29, n. 3, p. 295-299, Mar. 2010.

ECKERT, J. W.; OGAWA, J. M. The chemical control of postharvest diseases: Subtropical and tropical fruits. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 23, p. 421-454, Dec. 1985.

EDRIS, A. E.; FARRAG, E. S. Antifungal activity of peppermint and sweet basil essential oils and their major aroma constituents on some plant pathogenic fungi from the vapor phase. **Nahrung: chemie, biochemie, mikrobiologie, technologie, ernaehrung**, Berlin, v. 47, n. 2, p. 117-121, Apr. 2003.

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

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

INOUE, M. et al. Self-germination inhibitors from *Colletotrichum fragariae*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 22, n. 11, p. 2111-2122, Nov. 1996.

JARVIS, W. R. Latent infections in pre and postharvest environment. **Hortscience**, Alexandria, v. 29, n. 7, p. 749-751, July 1994.

KULAKIOTU, E. K.; THANASSOULOPOULOS, C. C.; SFAKIOTAKIS, E. M. Postharvest biological control of *Botrytis cinerea* on kiwifruit by volatiles of 'Isabella' grapes. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 94, n. 12, p. 1280-1285, Dec. 2004.

LEE, S. O. et al. Antifungal activity of five plant essential oils as fumigant against postharvest and soilborne plant pathogenic fungi. **Plant Pathology**, Oxford, v. 23, n. 2, p. 97-102, June 2007.

MARI, M.; BERTOLINI, P.; PRATELLA, G. C. Non-conventional methods for the control of post-harvest pear diseases. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 94, n. 5, p. 761-766, May 2003.

- MELO, P. C. T. Da preocupação com a contaminação de frutas e hortaliças por resíduos de defensivos agrícolas, nasceu o SIRAH, sistema que permite monitorar a qualidade dos alimentos. **Cultivar HF**, Pelotas, v. 7, n. 37, p. 31, abr./maio 2006.
- MING, L. C. Estudo e pesquisa de plantas medicinais na agronomia. **Horticultura Brasileira**, v. 12, n. 1, p. 3-9, maio 1994.
- MOITA NETO, J. M.; MOITA, G. C. Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados. **Química Nova**, São Paulo, v. 21, n. 4, p. 467-469, 1998.
- NERI, F. et al. Fungicidal activity of plant volatile compounds for controlling *Monilinia laxa* in stone fruit. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 91, n. 1 p. 30-35, Jan. 2007.
- 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, Mar. 2002.
- PERFECT, S. E. et al. *Colletotrichum*: a model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 27, n. 2/3, p. 186-198, July 1999.
- PLOTTO, A.; ROBERTS, D. D.; ROBERTS, R. G. Evaluation of plant essential oils as natural postharvest disease control of tomato (*Lycopersicon esculentum*). **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 628, p. 737-745, 2003.
- RANASINGHE, L.; JAYAWARDENA, B.; ABEYWICKRAMA, K. Fungicidal activity of essential oils of *Cinnamomum zeylanicum* (L.) and *Syzygium aromaticum* (L.) Merr et L.M.Perry against crown rot and anthracnose pathogens isolated from banana. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 35, n. 3, p. 208-211, 2002.
- RIEFLER, J.; NOVAK, J; KOSCHIER, E. H. Components of essential oils in plant protection. **Zeitschrift für Arznei e Gewurzpflanzen**, Berlin, v. 14, n. 2, p. 70-76, June 2009.
- ROCHE. Roche diagnostics GmbH. **Poly(oxyethylene)x-sorbitanemonolaurate, especially purified for membrane research**: cat. n. 11332465 001. Mannheim, 2008. Disponível em: <<https://www.roche-applied-science.com/pack-insert/1332465a.pdf>>. Acesso em: 23 jan. 2010.

ROZWALKA, L. C. et al. Extratos, decoctos e óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas na inibição de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides* de frutos de goiaba. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 2, p. 31-36, mar./abr. 2008.

SALGADO, A. P. S. P. et al. Avaliação da atividade fungitóxica de óleos essenciais de folhas de *Eucalyptus* sobre *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* e *Bipolaris sorokiniana*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 2, p. 249-254, mar./abr. 2003.

SELA-BUURLAGE, M. B.; EPSTEIN, L.; RODRIGUEZ, R. J. Adhesion of ungerminated *Colletotrichum musae* conidia. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 39, n. 5, p. 345-352, Nov. 1991.

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, June, 2006.

SINGH, G. et al. The vapour action of essential oils and monoterpenoids against pathogenic fungi. **Sugar Tech Journal**, Amsterdam, v. 4, n. 1/2, p. 69-71, Jun. 2002.

SOARES, F. D. et al. Volatile and non-volatile chemical composition of the white guava fruit (*Psidium guajava*) at different stages of maturity. **Food Chemistry**, London, v. 100, n. 1, p. 15-21, 2007.

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

SOYLU, E. M.; SOYLU, S.; KURT, S. Antimicrobial activities of the essential oils of various plants against tomato late blight disease agent *Phytophthora infestans*. **Mycopathologia**, Dee Haag, v. 161, n. 2, p. 119-128, Feb. 2006.

STANGARLIN, J. R. et al. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 2, n. 11, p. 16-21, nov./dez. 1999.

SUKATTA, U. et al. Antifungal activity of clove and cinnamon oil and their synergistic against postharvest decay fungi of grape *in vitro*. **Kasetsart Journal (Natural Science)**, Bangkok, v. 42, n. 5, p. 169-174, 2008.

TESKE, M.; TRENTINI, A. M. M. **Herbarium Compêndio de fitoterapia**. 3. ed. Curitiba: Herbarium Laboratório Botânico, 1997.

TRIPATHI, P.; DUBEY, N. K. Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables.

Postharvest Biology and Technology, Amsterdam, v. 32, n. 3, p. 235-245, June 2004.

TRIPATHI, P. et al. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 20, n. 3, p. 317-321, Apr. 2004.

TRIPATHI, P.; SHUKLA, A. K. Application of essential oils for postharvest control of stem end rot of mango fruits during storage. **International Journal of Postharvest Technology and Innovation**, Olney, v. 1, n. 4, p. 405-415, 2009.

TZORTZAKIS N. G.; ECONOMAKIS, C. D. Antifungal activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus* L.) essential oil against key postharvest pathogens.

Innovative Food Science e Emerging Technologies, Dublin, v. 8, n. 2, p. 253-258, June 2007.

TZORTZAKIS, N. G. Impact of cinnamon oil-enrichment on microbial spoilage of fresh produce. **Innovative Food Science e Emerging Technologies**, Dublin, v. 10, n. 1, p. 97-102, Jan. 2009.

WISNIEWSKI, M. E.; WILSON, C. L. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: recent advances. **Hortscience**, Alexandria, v. 27, n. 2, p. 94-98, Feb. 1992.

CAPÍTULO 3

Película à base de fécula de mandioca e óleos essenciais no controle de antracnose em frutos de goiabeiras (*Psidium guajava* L.)

RESUMO

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar o potencial da película à base de fécula de mandioca e dos óleos essenciais, em associação ou não, na conservação pós-colheita de goiabas, com ênfase no controle da antracnose causada por *C. gloeosporioides*. Os óleos essenciais de *Cymbopogon martinii*, *Eugenia caryophyllata*, *Thymus vulgaris* e *Cymbopogon citratus* a 0,1%, selecionados mediante potencial de inibição de *C. gloeosporioides* em testes *in vitro* em experimento anterior, foram incorporados aos géis de recobrimento obtidos a partir das suspensões de fécula de mandioca a 0,2% e a 2,0% (peso/volume), aquecidas até 90°C, sob agitação constante. Para a formação da película, após desinfestação e secagem, as goiabas verdes sem sintomas de doenças e danos mecânicos foram submetidas a 3 imersões de 1 minuto, com intervalos de 15 minutos, para escorrimento do excesso e pré-secagem. Os frutos do controle não revestidos com película e sem incorporação de óleos essenciais, revestidos com película a 0,2% e a 2,0% e os frutos revestidos com película de fécula a 0,2% e a 2,0%, com a incorporação dos óleos essenciais, foram acondicionados em suportes, mantidos em temperatura ambiente (26±2°C) e, após 24 horas, inoculados em 4 pontos equidistantes com discos de BDA contendo suspensão de conídios do patógeno (1 x 10⁵ conídios.mL⁻¹). Após 72 horas em câmara úmida (96±2%) e temperatura ambiente (26±2°C), os frutos foram colocados sobre bancadas no laboratório, para simular condição de comercialização. A severidade da antracnose nas goiabas foi determinada pela quantificação de área lesionada pelo patógeno, em porcentagem, pelo programa Image tool (UTHSCSA Image Tool). Para a realização da microscopia eletrônica de varredura, as amostras coletadas nos frutos recobertos com a película a 2,0% foram preparadas de acordo com o protocolo padrão do Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural e a observação e o registro de imagens foram realizados em microscópio eletrônico de varredura LEO Evo 40 XVP. A película à base de fécula de mandioca a 2,0%, com ou sem incorporação de óleos essenciais de *Cinnamomum* sp., *Eugenia caryophyllata*, *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon citratus* e *Thymus vulgaris*, se apresentou como uma barreira ao desenvolvimento do patógeno latente ou inoculado, não ocorrendo o desenvolvimento de lesões típicas de antracnose nas goiabas, aumentando a vida útil de prateleira.

Palavras-chave: Goiaba. Biofilme. Patologia pós-colheita de frutos. Controle alternativo de doenças.

ABSTRACT

The present study had as an objective to evaluate the potential of cassava starch based film (coating or pellicle) and the essential oils, in association or not, on the postharvest conservation of guavas, with emphasis on the control of anthracnose caused by *C. gloeosporioides*. The essential oils of *Cymbopogon martinii*, *Eugenia caryophyllata*, *Thymus vulgaris* and *Cymbopogon citratus* at 0.1% selected for potential of *C. gloeosporioides* inhibition in *in vitro* tests in a previous experiment were incorporated to the coating gels obtained from the suspensions of cassava starch at 0.2% and 2.0% (weight/volume) and heated to 90 °C, under constant agitation. For pellicle formation, after disinfestation and drying, the green guavas without symptoms of disease and mechanical damage were submitted to 3 immersions for 1 minute with 15 minute intervals for draining of the excess and pre-drying. The non-film coated and without essential oil incorporation control fruits; those covered with pellicle at 0.2% and 2.0%; and the fruits covered with starch pellicle at 0.2% and 2.0% with the essential oil incorporation the were conditioned on supports, maintained at room temperature (26 ± 2 °C) and after 24 hours, inoculated with PDA disks containing pathogen conidia suspensions (1×10^5 conidia.mL⁻¹) at 4 equidistant points. After 72 hours in moisture chamber ($96 \pm 2\%$) and room temperature (26 ± 2 °C), the fruits were put on benches in the laboratory to simulate commercialization conditions. The severity of the anthracnose in the guavas was determined by the quantification of the percentage of the area damaged by the pathogen by the Image tool program (UTHSCSA Image Tool). For the scanning electronic microscopy, the samples collected in the fruits coated with the film at 2.0% were prepared according to the standard protocol of the Electron Microscopy Laboratory and Ultrastructural Analysis and the observation and the registration of images were conducted in a LEO Evo 40 XVP scanning electron microscope. The cassava starch based film at 2.0%, with or without incorporation of essential oils of *Cinnamomum* sp., *Eugenia caryophyllata*, *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon citratus* and *Thymus vulgaris*, were shown as a barrier to the development of the latent or inoculated pathogen, the development of typical anthracnose lesions not occurring in the guavas, increasing the shelf life.

Keywords: Guava. Biofilm. Postharvest pathology of fruits. Alternative control of diseases.

1 INTRODUÇÃO

No ranking de produção mundial de frutas, o Brasil ocupa o terceiro lugar, atrás da China (175 milhões de toneladas) e da Índia (57 milhões de toneladas), com 43 milhões de toneladas produzidas entre frutas tropicais, subtropicais e temperadas ao longo de todo o ano. Porém, a exportação brasileira de frutas não alcança 2% do mercado mundial (ALMEIDA, 2002; BUAINAIN; BATALHA, 2007).

A reduzida inserção dos produtos tropicais no mercado de frutas frescas apresenta-se como consequência do uso inadequado de agrotóxicos e da tecnologia de pós-colheita deficiente, que determinam o baixo padrão de qualidade das frutas sob o enfoque de exigências internacionais de um mercado importador concentrado e exigente, protegido por barreiras fitossanitárias (ALMEIDA, 2002). A contaminação de produtos hortícolas por resíduos de agrotóxicos tem sido alvo da mídia, causando impactos negativos à cadeia produtiva das frutas e hortaliças, devido à aplicação em dosagem excessiva ou de produtos não recomendados (MELO, 2006), tanto em pré como em pós-colheita.

A goiabeira (*Psidium guajava* L.), devido à adaptação a diferentes condições edafoclimáticas e à facilidade da propagação por meio de sementes (GONZAGA NETO, 1990), encontra-se amplamente distribuída nos trópicos e subtropicais, tornando-se nativa em muitas áreas, sendo, em algumas, considerada planta daninha (LIM; MANICON, 2003). Produzida de norte a sul no Brasil, a cultura da goiabeira tem importância econômica e social, em virtude das múltiplas formas de aproveitamento de seus frutos (MAIA; GARCIA; LEITE, 1988), como produto de exportação para países do hemisfério norte (ALMEIDA, 2002) e pela necessidade de mão-de-obra, praticamente durante o ano todo (GONZAGA NETO et al., 1982). O estado de Pernambuco destaca-se

como o maior produtor nacional, com produção de 96.733 toneladas, seguido pelos estados de São Paulo, com 89.772 toneladas e Pará, com 18.672 toneladas. Em 2008, o estado de Minas Gerais ocupou a 5ª colocação no ranking brasileiro de produção de goiabas (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2009).

No Brasil, a antracnose, ou mancha-chocolate, causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penzig) Arx (= *Gloeosporium psidii* Delacr.), cuja forma sexuada corresponde a *Glomerella cingulata* (Stonem) Spauld e Schrenk, apresenta-se como uma das doenças mais graves em pós-colheita de frutos de goiabeira (GORGATTI NETTO, 1996). A antracnose ocasiona perdas significativas, decorrentes da redução do período de comercialização, desclassificação e descarte de produtos, comprometendo o aspecto econômico, ainda que a cultura da goiabeira seja submetida ao controle químico em pré-colheita. Em todos os países produtores de frutos de goiabeiras, a antracnose destaca-se como a doença mais comum em pré e em pós-colheita, podendo causar consideráveis perdas pós-colheita (LIM; MANICON, 2003).

Segundo informações do registro de agrotóxicos e afins constantes no Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (AGROFIT) em acordo com as bulas aprovadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Coordenação-Geral de Agrotóxicos e Afins/DFIA/SDA, atualmente, não há produtos registrados para uso em pós-colheita para a cultura da goiabeira (AGROFIT, 2010).

É importante ressaltar que, para a obtenção de eficiência do controle de doenças em pós-colheita dos frutos de goiabeiras, considerando o reduzido período de conservação de poucas semanas, estratégias devem ser estabelecidas, com base no processo de maturação.

Para a manutenção da qualidade pós-colheita em relação às características físico-químicas, nos últimos anos, tem-se observado um interesse

considerável na utilização de filmes e coberturas essencialmente compostos por amido, que é encontrado em abundância na natureza, tem caráter renovável e custo relativamente baixo, sendo, portanto, uma grande fonte de exploração econômica (RÓZ et al., 2001). Alguns autores relataram a eficiência dos filmes e coberturas biodegradáveis à base de fécula de mandioca para a conservação pós-colheita de morango (HENRIQUE; CEREDA, 1999), goiabas (OLIVEIRA; CEREDA, 1999), tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) (DAMASCENO et al., 2003), acerola, (MACIEL et al., 2004), pepino-japonês (*Cucumis sativus* L.) (REIS et al., 2006) e mamão (PEREIRA et al., 2006). Porém, a contribuição desta técnica para o controle de fitopatógenos em pós-colheita não é claramente tratada nos trabalhos.

Outra possibilidade baseia-se na utilização de produtos naturais obtidos de plantas para o controle de doenças em pós-colheita, representando menor risco para a saúde humana e para o ambiente (KULAKIOTU; THANASSOULOPOULOS; SFAKIOTAKIS, 2004), como, por exemplo, os óleos essenciais largamente utilizados especialmente na indústria farmacêutica, por suas propriedades antibacteriana, antifúngica e inseticida, já observadas na natureza (BAKKALI et al., 2008). A atividade antifúngica de compostos naturais biologicamente ativos em óleos essenciais presentes em plantas medicinais, condimentares, ornamentais e florestais, *in vitro* e *in vivo*, sobre fitopatógenos, foi relatada por alguns autores. Entretanto, os estudos são em número reduzido para o controle de *C. gloeosporioides* (LEE et al., 2007; DUAMKHAMANEE, 2008; BARRERA-NECHA et al., 2008; SUKATTA et al., 2008; ROZWALKA et al., 2008; ANARUMA et al., 2010) e *Colletotrichum* sp. (SINGH et al., 2002; RANASINGHE; JAYAWARDENA; ABEYWICKRAMA, 2002; SHAHI et al., 2003; TZORTZAKIS; ECONOMAKIS, 2007; ARROYO et al., 2007; TZORTZAKIS, 2009).

A inibição do crescimento microbiano pode ser obtida pelo efeito

sinérgico da combinação de vários fatores ou obstáculos, em vez de ser alcançada pela aplicação drástica de um único fator de conservação (LEISTNER, 1992). A tecnologia de métodos combinados (TMC), também conhecida como tecnologia de obstáculos (*hurdle technology*), preconiza a combinação de dois ou mais obstáculos ao crescimento microbiano, aplicados em baixos níveis, para promover a estabilidade do alimento em temperatura ambiente (ALZAMORA et al., 1993). Assim, para o controle de doenças em pós-colheita, o aumento da vida de prateleira e a manutenção das características físico-químicas dos frutos de goiabeiras, a combinação de óleos essenciais e fécula de mandioca sob a forma de película apresenta-se como mais uma estratégia promissora.

Diante do exposto, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar o potencial de película à base de fécula de mandioca e óleos essenciais em associação ou não na conservação pós-colheita de frutos de goiabeira, com ênfase no controle de *C. gloeosporioides*, agente etiológico da antracnose.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local de realização dos experimentos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural (LME), do Departamento de Fitopatologia (DFP) e Laboratório de Pós-Colheita do Departamento de Ciência dos Alimentos (DCA), da Universidade Federal de Lavras (UFLA) em Lavras, MG.

2.2 Obtenção e seleção dos óleos essenciais

Os óleos essenciais foram selecionados mediante potencial de inibição ao patógeno, observado em testes *in vitro*, em experimento anterior (Capítulo 2).

Os óleos essenciais de *Cymbopogon martinii* (palmarosa), *Eugenia caryophyllata* (cravo-da-índia), *Thymus vulgaris* tomilho (comum) e *Cymbopogon citratus* (capim-limão) foram fornecidos pela Chamel (Indústria e Comércio de Produtos Naturais, Paraná, Brasil). O óleo de *Cinnamomum* sp. (canela) foi obtido por hidrodestilação, utilizando aparelho tipo Clevenger, a partir de 100 g de casca em 1.000 mL de água sob aquecimento contínuo, durante 3 horas.

2.3. Obtenção e preparo dos frutos de goiabeira (*Psidium guajava*, L.)

Frutos verdes e ensacados de goiabeira da cultivar Pedro Sato foram colhidos no pomar comercial da Fazenda Pasto Fechado, situada a 877 m de altitude, 21°13'30,77" de latitude Sul e 44°59'06,01" longitude Oeste, na cidade de Lavras, estado de Minas Gerais, Brasil e imediatamente transportados para o Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras, que se encontra a, aproximadamente, 1.000 m da fazenda.

Os frutos verdes sem sintomas de doenças e qualquer dano mecânico foram selecionados e submetidos à lavagem em água corrente (2 minutos), desinfestação em hipoclorito de sódio a 1% (NaClO), durante 3 minutos e lavagem em água destilada.

2.4 Obtenção da fécula de mandioca

A fécula de mandioca (T09/141) foi fornecida pela Gemacom (Comércio e Serviços Ltda., Minas Gerais, Brasil).

2.5 Películas biodegradáveis à base de fécula de mandioca e óleos essenciais no controle de *Colletotrichum gloeosporioides* em frutos de goiabeira

2.5.1 Preparo dos géis para recobrimento dos frutos de goiabeira

As suspensões de fécula de mandioca a 0,2% e a 2,0% (peso/volume) foram aquecidas até 90°C, sob agitação constante, para a obtenção de géis para recobrimento dos frutos de goiabeira e formação de película.

Os óleos essenciais de palmarosa, cravo-da-índia, tomilho e capim-limão e canela a 0,1% foram incorporados aos géis após o resfriamento dos mesmos à temperatura ambiente, para o revestimento de frutos de goiabeira.

2.5.2 Cobertura dos frutos de goiabeira

Após o processo de desinfestação como descrito no item 2.3, os frutos de goiabeira acondicionados sobre papel de filtro permaneceram em temperatura ambiente ($25\pm 2^\circ\text{C}$), durante 12 horas, aproximadamente, para secagem.

Os tratamentos e frutos foram numerados e distribuídos ao acaso.

Para o recobrimento dos frutos de goiabeira, foi utilizada a técnica de

imersão, tendo sido estabelecidas como procedimento a imersão durante 1 minuto, a retirada do excesso (escorrimento) e a secagem por 15 minutos, repetidas 3 vezes, nos seguintes tratamentos:

- frutos não revestidos com película de fécula de mandioca, sem incorporação de óleos essenciais (controle);

- frutos revestidos com película de fécula de mandioca (2%);

- frutos revestidos com película de fécula de mandioca (0,2%);

- frutos revestidos com película de fécula de mandioca (2%), com a incorporação de palmarosa a 0,1%;

- frutos revestidos com película de fécula de mandioca (0,2%), com a incorporação de palmarosa a 0,1%;

- frutos revestidos com película de fécula de mandioca (2%), com a incorporação de cravo-da-índia a 0,1%;

- frutos revestidos com película de fécula de mandioca (0,2%), com a incorporação de cravo-da-índia a 0,1%;

- frutos revestidos com película de fécula de mandioca (2%), com a incorporação de tomilho a 0,1%;

- frutos revestidos com película de fécula de mandioca (0,2%), com a incorporação de tomilho a 0,1%;

- frutos revestidos com película de fécula de mandioca (2%), com a incorporação de capim-limão a 0,1%;

- frutos revestidos com película de fécula de mandioca (0,2%), com a incorporação de capim-limão a 0,1%;

- frutos revestidos com película de fécula de mandioca (2%), com a incorporação de canela a 0,1% e

- frutos revestidos com película de fécula de mandioca (0,2%), com a incorporação de canela a 0,1%.

Os frutos foram acondicionados em suportes (recipientes de plástico

para ovo de Páscoa) e mantidos em temperatura ambiente (26 ± 2 °C), durante 24 horas.

2.5.3 Inoculação

Após 24 horas, os frutos foram inoculados em 4 pontos equidistantes com discos de BDA (batata-dextrose-ágar) contendo suspensão de conídios de *C. gloeosporioides* (1×10^5 conídios.mL⁻¹), 24 horas após o tratamento e mantidos em câmara úmida ($96\pm 2\%$) e temperatura ambiente (26 ± 2 °C), durante 72 horas. Após esse período, os frutos foram retirados da câmara úmida, permanecendo sobre bancadas no laboratório para simular uma condição de comercialização.

2.6 Severidade da antracnose em frutos de goiabeira

Frutos de goiabeira não revestidos com película de fécula de mandioca, sem incorporação de óleos essenciais (controle) foram recobertos com película à base de fécula de mandioca (0,2% e 2,0%), com e sem incorporação de óleos essenciais; revestidos com película de fécula de mandioca (2%); revestidos com película de fécula de mandioca (2%) com incorporação de extrato de casca de goiaba verde; imersos em extrato de casca de goiaba verde; imersos em água (controle) e expostos à volatilização de 20 µL dos óleos essenciais. A porcentagem de área lesionada pelo patógeno foi quantificada pelo programa Image tool (UTHSCSA Image Tool), mediante imagens obtidas no decorrer do experimento.

2.7 Preparo das amostras de frutos de goiabeira cobertos com película à base de fécula de mandioca (2%) para microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para a realização da microscopia eletrônica de varredura, as amostras foram coletadas nos frutos cobertos com a película à base de fécula de mandioca a 2,0%, como descrito no item 2.5.1, deste trabalho.

Após fixação em Karnovsky modificado, as amostras foram submetidas à pós-fixação em tetróxido de ósmio (OsO_4) a 2%, à desidratação em série crescente de acetona nas concentrações de 25%, 50%, 75%, 90% e 100% e ao processo de secagem em aparelho de ponto crítico BAL-TEC CPD 030. Os espécimes obtidos foram fixados com fita dupla-face de carbono em suportes metálicos (stubs de alumínio) revestidos com papel alumínio, submetidos ao processo de metalização (*sputtering*) em ouro (banho de ouro), em aparelho BAL-TEC SCD 050 e armazenados em dessecador contendo sílica-gel. A observação das amostras e o registro de imagens foram realizados em microscópio eletrônico de varredura LEO Evo 40 XVP

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Películas biodegradáveis à base de fécula de mandioca e óleos essenciais no controle de *Colletotrichum gloeosporioides* em frutos de goiabeira

3.1.1 Cobertura dos frutos de goiabeira

Em experimento preliminar, dados não apresentados, a desuniformidade na coloração da casca dos frutos tratados, representada pelas manchas de coloração amarela caracterizando maturação desuniforme, incitou questionamento sobre a aplicação do gel, que consistiu na imersão por 3 minutos e secagem para a formação de película à base de fécula de mandioca a 2,0%.

Considerando-se que amilopectina e a amilose presentes na composição do amido, ao se combinarem com o iodo, originam uma cor vermelho-violeta e azul, respectivamente (BLAZEVIC; EDERER, 1975), com a aplicação de Lugol (5 g de iodo I₂ e 10 g de iodeto de potássio KI em 100 mL com água destilada, diluído 10 vezes) sobre os frutos tratados, comprovou-se a descontinuidade da película (Figura 1).

Evidenciou-se, assim, a necessidade de modificação na metodologia de aplicação do gel. O experimento foi repetido com a metodologia modificada para 3 imersões de 1 minuto cada, com intervalos de 15 minutos para a retirada do excesso e secagem. Observou-se, então, mediante a aplicação de Lugol, a formação da película mais contínua. Entretanto, a cobertura não atingiu 100% da área dos frutos, destacando-se a presença de manchas de coloração amarelada, porém, em área significativamente reduzida (Figura 2).

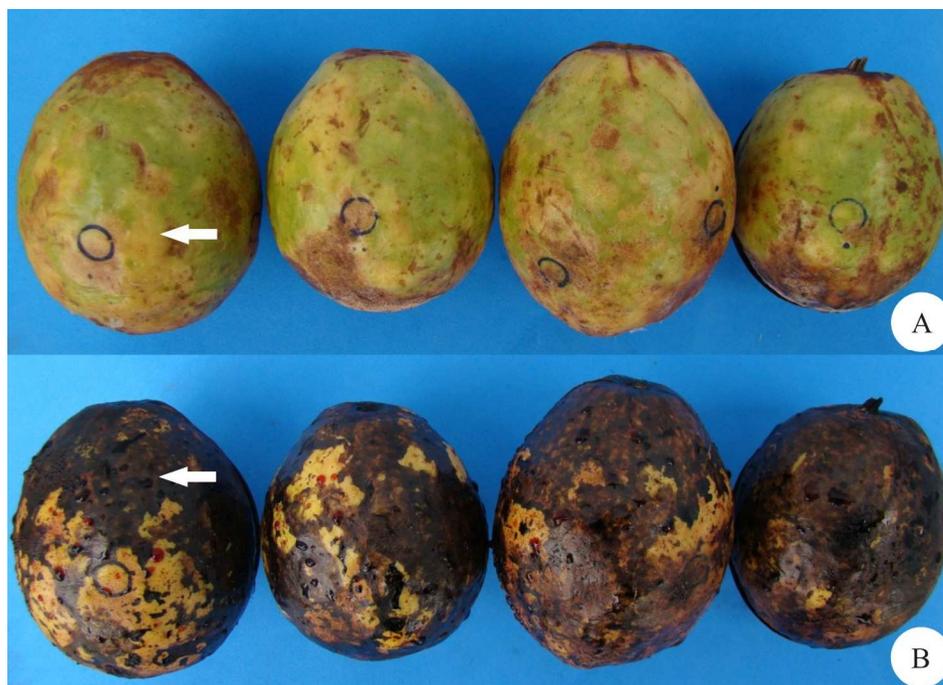


Figura 1 Descontinuidade da película (A), caracterizada pela coloração vermelho-violeta e azul, mediante a aplicação de Lugol (solução de iodo I_2 e iodeto de potássio KI), indicando a presença de amido (B) em frutos de goiabeira (cv. Pedro Sato).



Figura 2 Uniformidade da película no recobrimento de frutos de goiabeira (cv. Pedro Sato), mediante técnica de imersão modificada para 3 tempos de 1 minuto, com intervalos de 15 minutos, revelada pela aplicação de Lugol (solução de iodo I_2 e iodeto de potássio KI).

A descontinuidade e também o rompimento da película podem favorecer a maturação desuniforme e o desenvolvimento do patógeno (Figura 3).

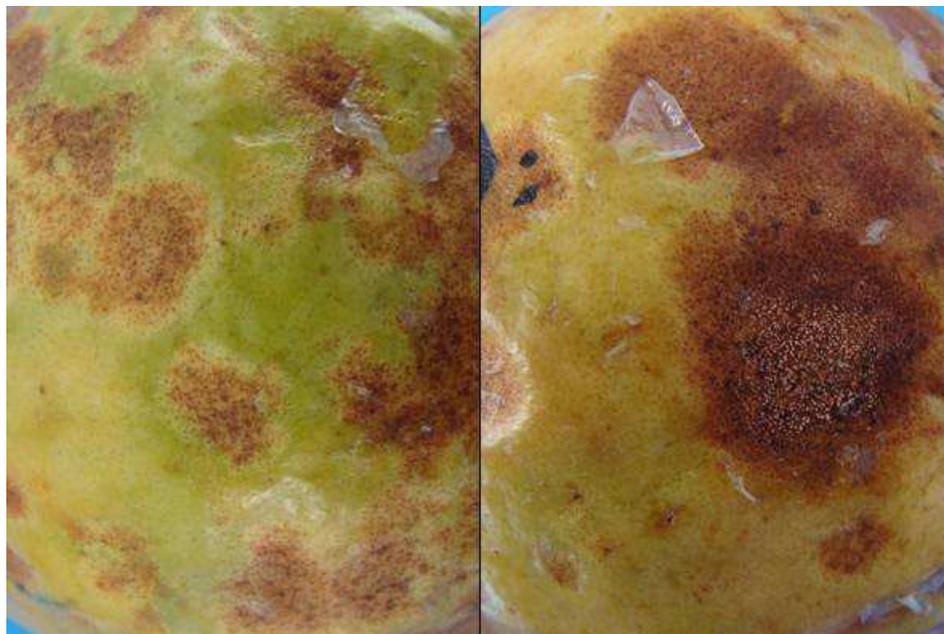


Figura 3 Maturação desuniforme representada pelas manchas amareladas e o desenvolvimento do patógeno *Colletotrichum gloeosporioides*, favorecidos pela descontinuidade e o rompimento da película à base de fécula de mandioca a 2,0%, em frutos de goiabeira.

Pode-se atribuir descontinuidade, como também o rompimento da película, a problemas durante o seu preparo, principalmente na fase de gelatinização, quando atenção deve ser dada ao ponto de formação do gel ou solução viscosa pela perda birrefringência, ou seja, quando os grãos de amido perdem a estrutura de cristais. A formação do gel foi observada quando a solução atingiu aproximadamente 90°C, ocorrendo a perda de viscosidade quando o aquecimento prolongou-se até fervura. Também, a forma de aplicação

e o acondicionamento dos frutos durante a secagem devem ser observados.

Por meio de eletrofotomicrografias de varredura, Cereda et al. (2000) observaram, em filmes de amido, a formação de uma superfície contínua com porosidade controlada. Atribuíram a presença de pequenos poros à microbolhas de ar formadas durante o aquecimento e o revestimento.

No presente trabalho, nas amostras analisadas por meio de microscopia eletrônica de varredura, foi possível observar a presença de microbolhas de ar na película à base de fécula de mandioca a 2,0% aplicada nos frutos de goiabeiras (Figura 3).

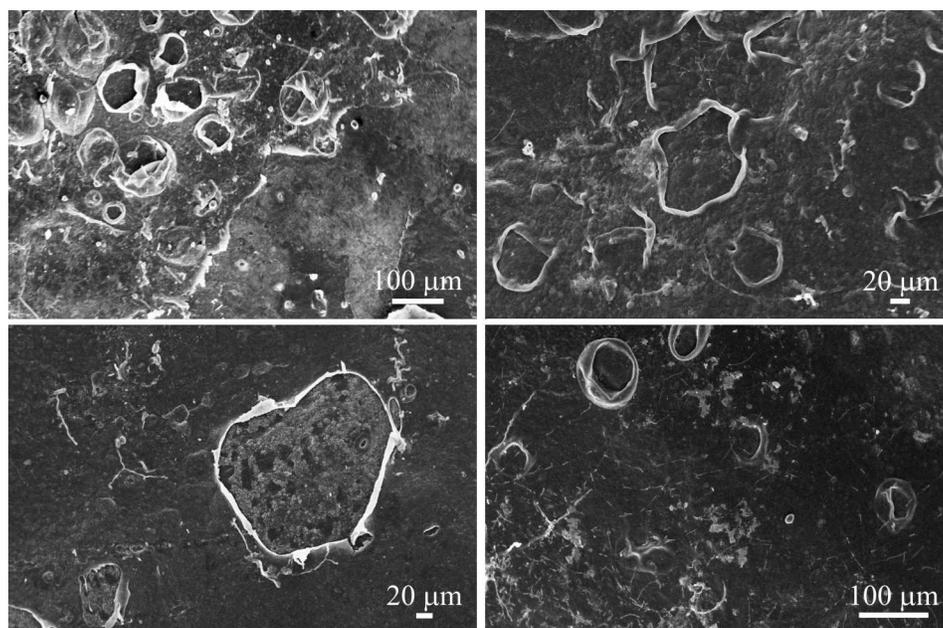


Figura 3 Eletromicrografia de varredura de películas à base de fécula de mandioca a 2,0%, aplicadas em frutos de goiabeira, apresentando microbolhas de ar rompidas ou não.

3.1.2 Severidade da antracnose em frutos de goiabeira

A eficiência dos tratamentos foi avaliada mediante a quantificação de área lesionada (%) pelo patógeno *C. gloeosporioides*, revelando maior severidade da doença nos frutos de goiabeira não revestidos com película de fécula de mandioca e sem incorporação de óleos essenciais (controle) do que nos recobertos com película à base de fécula de mandioca (0,2 e 2,0%) com e sem incorporação de óleos essenciais (Figuras 5A-H; e Tabela 1).



Figura 5 Severidade da antracnose em goiabas cobertas com película de fécula de mandioca a 2,0% e a 0,2%, sem e com incorporação de óleos essenciais a 0,1%, no 10º dia após a colheita.

Tabela 1 Área lesionada (%) por *Colletotrichum gloeosporioides* em frutos de goiabeira no 10º dia após a colheita e porcentagens de frutos com lesão e frutos com lesão inferiores a 10%.

Área lesionada (%)	Tratamentos						
	<i>Cinnamomum</i> sp.	<i>Cymbopogon</i> <i>citratius</i>	<i>Cymbopogon</i> <i>martinii</i>	<i>Eugenia</i> <i>caryophyllata</i>	<i>Thymus</i> <i>vulgaris</i>	Controle	Película a 0,2%
≤10%	1,0	-	2,5	0,0	3,0	0,0	0,0
	2,5	-	3,1	0,0	4,4	0,8	0,0
	8,8	-	3,1	0,3	5,4	3,8	0,0
	-	-	4,3	0,6	8,1	8,2	0,5
	-	-	5,3	2,5	-	-	2,2
	-	-	5,6	3,6	-	-	4,1
	-	-	6,0	4,1	-	-	5,4
	-	-	-	8,4	-	-	6,1
10%-20%	10,5	16,6	12,2	10,4	12,5	10,2	10,5
	19,3	19,8	19,2	16,9	-	12,1	12,6
	19,8	-	-	-	-	12,4	13,7
	-	-	-	-	-	14,1	19,6
	-	-	-	-	-	14,8	-
	-	-	-	-	-	18,3	-
20%-30%	23,7	21,8	-	23,9	20,7	24,6	22,5
	24,8	29,4	-	-	27,1	28,0	26,9
	26,5	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-
30%-40%	31,6	32,0	30,0	31,7	32,2	30,6	-
	33,1	33,4	33,7	32,5	34,6	-	-
	34,3	35,6	-	37,0	35,0	-	-
	39,5	-	-	-	-	-	-
40%-50%	49,5	44,3	45,7	-	42,7	-	42,1
	-	45,7	64,6	-	45,7	-	-
	-	46,8	-	-	-	-	-
	-	48,5	-	-	-	-	-
	-	48,5	-	-	-	-	-
-	49,3	-	-	-	-	-	
≥50%	84,3	52,7	75,5	70,2	51,9	56,2	-
	-	55,9	81,6	-	60,1	69,3	-
	-	-	-	-	98,0	-	-
% de frutos com lesão	100,0	100,0	100,0	86,7	100,0	93,3	80,0
% de frutos com lesão ≤10%	20,0	0,00	46,7	53,3	26,7	26,7	53,3

Nos frutos cobertos com a película sem e com a incorporação dos óleos essenciais, a severidade de *C. gloeosporioides* apresentou valores inferiores a 1%.

Os tratamentos à base de fécula de mandioca a 0,2% e mesmo com incorporação do óleo essencial de cravo-da-índia e palmarosa demonstraram eficiência relativa na inibição da antracnose, comprovada pelas porcentagens em torno de 53%, 53% e 47%, respectivamente, de frutos com área lesionada abaixo de 10% superiores ao controle (26%). Os tratamentos à base de fécula de mandioca a 0,2% com incorporação do óleo essencial de tomilho (26%) e canela (20%) igualaram-se ao controle (26%). O óleo essencial de capim-limão, associado à película a 0,2%, não proporcionou a redução de severidade do patógeno, observando-se que 100% dos frutos apresentaram área lesionada superior a 10%.

De acordo com o Programa Brasileiro para a Modernização da Horticultura (2000), operacionalizado pelo Centro de Qualidade em Horticultura da CEAGESP, as podridões definidas como danos patológicos que impliquem em qualquer grau de decomposição, desintegração ou fermentação dos tecidos, incluindo as manchas de antracnose em qualquer número ou intensidade, apresentam-se como defeitos graves. Destaca-se, entre as normas de classificação adotadas pelo programa para a comercialização de goiabas, a desclassificação de todo o lote que apresentar podridão acima de 10% e resíduos de substâncias nocivas à saúde acima dos limites de tolerância. Nesse contexto, apenas os tratamentos à base de fécula de mandioca a 2,0% demonstraram eficiência no controle de *C. gloeosporioides*, atendendo às necessidades do mercado, reduzindo as perdas e garantindo a segurança alimentar pela ausência de produtos tóxicos nocivos ao homem e ao ambiente.

Duamkhanmanee (2008) observou a eficiência do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus*) no controle da antracnose em pós-colheita

de frutos de manga (Nam Dokmai), na concentração de 4.000 ppm (4 mL.L⁻¹) em água quente, antes e após a inoculação, com suspensão de esporos de *C. gloeosporioides*, com notas médias mínimas de 2,40 e 1,85, respectivamente. Já as notas médias dos tratamentos de carbendazim a 100 ppm em água quente foram 2,60 e 1,95, respectivamente.

Barrera-Necha et al. (2008) verificaram a redução percentual de infecção (33,2%) de *Colletotrichum gloeosporioides*, estatisticamente diferentes do controle, em mamões tratados com os óleos essenciais de *Cinnamomum zeylanicum* a 250 µg.mL⁻¹ (17,33%) e *Syzygium aromaticum* a 50 e a 250 µg.mL⁻¹ (13,2% e 13,2%) após o armazenamento a 28°C, durante 5 dias. A 14°C, após 8 dias, *C. zeylanicum* e *S. aromaticum* a 50 e a 250 µg.mL⁻¹ (13,2% e 13,2%) também diferiram estatisticamente do controle (33,3%) e *S. aromaticum* a 50 µg.mL⁻¹ apresentou-se estatisticamente igual ao fungicida.

Os óleos essenciais obtidos a partir da casca a 0,2% (v/v) (2,0 mL.L⁻¹) e de folhas a 0,22% (v/v) (2,2 mL.L⁻¹) de *Cinnamomum zeylanicum* (canela), aplicados em bananas 'Embul' (Musa AAB) maduras demonstraram eficiência, reduzindo significativamente a severidade da podridão-da-coroa causada por *Fusarium* sp., *Lasiodiplodia theobromae* e *Colletotrichum musae*, em relação ao controle a 28°C, por 14 dias e a 14°C, por 21 dias, sob atmosfera modificada por embalagens de polietileno de baixa densidade (0,075 mm). Porém, o óleo de *Syzygium aromaticum* (cravo-da-índia) a 0,16% (v/v) (1,6 mL.L⁻¹) não inibiu o desenvolvimento dos patógenos. No controle de antracnose, estes óleos não demonstraram eficiência (RANASINGHE; JAYAWARDENA; ABEYWICKRAMA, 2005).

Diante do exposto, pode-se inferir que a ineficiência dos óleos essenciais de canela, cravo-da-índia, palmarosa, capim-limão e tomilho a 0,1% (1 mL.L⁻¹) no controle do patógeno, no presente trabalho, esteja diretamente relacionada a concentração utilizada. Também, não se pode negligenciar que, nos trabalhos

citados anteriormente, ocorreu a associação dos óleos a outros obstáculos ao crescimento microbiano como temperatura e embalagens.

Aos 7 dias após a inoculação, observou-se incidência reduzida do patógeno inoculado nos tratamentos à base de fécula de mandioca a 0,2% (41,67%) e à base de fécula de mandioca a 0,2 % com incorporação do óleo essencial de tomilho (33,33%). Nos tratamentos à base de fécula de mandioca a 0,2%, com incorporação dos óleos essenciais de palmarosa, cravo-da-índia, capim-limão e canela a 0,1% foram observadas as porcentagens de incidência de 62,00%, 50,00%, 60,42%, 64,58% e 56,25%, respectivamente, superiores ao controle (54,17%). Nos tratamentos à base de fécula de mandioca a 2,0%, com ou sem incorporação dos óleos essenciais, não foram observadas lesões.

Essa eficiência pode estar diretamente associada à interferência da película sobre o processo de maturação dos frutos. A manutenção da coloração verde, mesmo após a lavagem de frutos, quinze dias após o tratamento, indica que a película bloqueou de forma irreversível as reações enzimáticas e químicas responsáveis pela degradação da clorofila, bem como a síntese de pigmentos. Supostamente, compostos inibidores na casca dos frutos verdes foram degradados de forma mais lenta, impedindo ou atrasando o desenvolvimento do patógeno. Entretanto, foi possível observar, por meio de microscopia eletrônica de varredura, que, apesar de ter ocorrido a colonização dos tecidos dos frutos de goiabeira, a película apresentou-se como uma barreira eficiente, limitando o desenvolvimento do patógeno, a formação de acérvulos e impedindo, conseqüentemente, a formação das lesões típicas de antracnose (Figura 4).

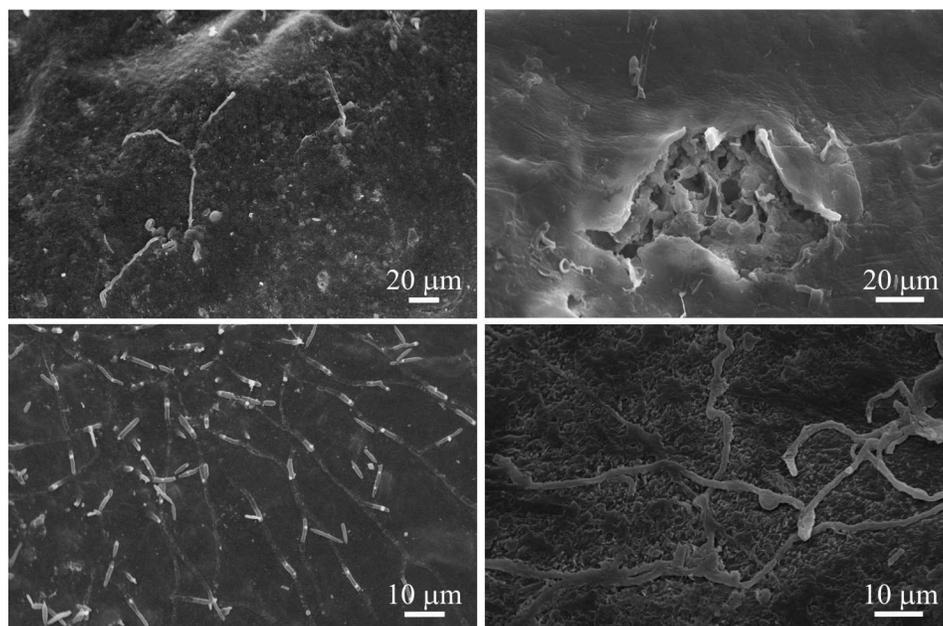


Figura 4 Eletromicrografias de varredura de película à base de fécula de mandioca a 2,0% como barreira limitando o desenvolvimento do patógeno e impedindo, conseqüentemente, a formação das lesões típicas de antracnose.

No momento da aplicação dos géis para a formação das películas, nos tratamentos contendo os óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* (capim-limão) e *Cymbopogon martinii* (palmarosa) a 0,1% (1 ml.L^{-1}), foram observadas pequenas manchas escurecidas nos frutos, confirmadas posteriormente como fitotoxidez. Porém, não se observou desenvolvimento do patógeno sobre essas. Anaruma et al. (2010) observaram o escurecimento da casca dos frutos de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg), em cerca de 33,3%, 76,6% e 100%, nas concentrações de $0,12 \text{ g.L}^{-1}$, $0,25 \text{ g.L}^{-1}$ e $0,50 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente, prejudicando a aparência e a qualidade e tornando-os mais suscetíveis a *C. gloeosporioides*, agente da antracnose. O maior índice de doença foi observado na maior concentração. Entretanto, atenção deve ser dada ao

período de latência ou quiescência apresentada pelo patógeno *C. gloeosporioides*.

Verhoeff (1974) definiu a relação parasitária latente, dormente ou quiescente como uma condição na qual os patógenos passam longos períodos durante a vida do hospedeiro em uma fase quiescente, até que, sob circunstâncias específicas, tornam-se ativos. Epidemiologistas referem-se ao período de deposição de esporos até a produção de esporos novos nos tecidos parasitados como um período de latência (VANDERPLANK, 1963). Para evitar confusão, Swinburne (1983) propôs o termo "período de repouso", para diferenciar a relação parasitária quiescente do período latente. A quiescência pode ocorrer durante os vários processos de ataque de fungos e a latência durante todo o processo que conduz da germinação fúngica da colonização. Diante dessas definições, Prusky (1996) relatou que a quiescência pode ocorrer em diferentes fases de ataque dos patógenos em pós-colheita, como durante a germinação de esporos e o desenvolvimento inicial da hifa, durante e após a formação de apressórios, em apressórios germinados (peg de infecção) e em hifas subcuticulares. Daquinoag e Quimio (1978) e Binyamini e Schiffmann-Nadel (1972) relataram que a quiescência de *C. gloeosporioides* em manga e abacate, respectivamente, ocorreu na forma de apressórios germinados com a formação de peg de penetração. Daykin e Milholland (1984) demonstraram que, em uva (*Vitis rotundifolia*), o mesmo patógeno produziu apressórios que germinaram e penetraram a cutícula, permanecendo quiescentes até a maturação.

Adam et al. (1949) e Brown (1975) demonstraram que as hifas subcuticulares apresentaram-se como estruturas de quiescência de *C. gloeosporioides* em frutas cítricas. Assim, pode-se inferir, ainda, que tal ineficiência tenha ocorrido em função da estrutura de quiescência, principalmente em apressórios germinados (peg de infecção) e em hifas subcuticulares, considerando-se que os óleos não tenham conseguido penetrar a

epiderme dos frutos e inibir o desenvolvimento do patógeno.

Trabalhos que tratam de películas ou coberturas à base de fécula de mandioca associadas a óleos essenciais, enfocando o controle de doenças, praticamente inexistem. Plooy; Regnier; Combrinck (2009) relataram a eficiência de coberturas associadas a óleos essenciais e compostos no controle de *Penicillium digitatum* em citrus, porém, feitas a partir de ceras comerciais. No presente trabalho apresenta-se como vantagem o baixo custo da cobertura. O preço da fécula de mandioca no mercado está em torno de R\$ 1,80 por kg, com perspectiva de redução na safra para R\$1,20 (GEMACOM, 2010).

Com base nos resultados obtidos, para a consolidação da aplicação de películas associadas ou não a óleos essenciais como uma estratégia no controle alternativo de doenças em pós-colheita, faz-se necessária a realização de novos estudos voltados para a determinação de concentrações de óleos essenciais superiores às utilizadas e de fécula entre 0,2% e 2,0%.

4 CONCLUSÕES

A película à base de fécula de mandioca a 2,0%, com ou sem incorporação de óleos essenciais de canela, cravo-da-índia, palmarosa, capim-limão e tomilho se apresentou como uma barreira ao desenvolvimento do patógeno latente ou inoculado, não ocorrendo o desenvolvimento de lesões típicas de *C. gloeosporioides* nos frutos de goiabeiras, aumentando a vida pós-colheita.

REFERÊNCIAS

- ADAM, D.B. et al. The estimation of latent infection in oranges. **Australian Journal of Scientific Research**, B2: 1-18, 1949.
- AMIRI, A. et al. *In vitro* and *in vitro* activity of eugenol oil (*Eugenia caryophyllata*) against four important postharvest apple pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 12, n. 1, p. 13-19, Jan. 2008.
- AMORIM, L. Infecção. In: AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. cap. 15, p. 295-308.
- AZIZI, M. et al. Inhibitory effect of some medicinal plants' essential oils on postharvest fungal disease of citrus fruits. In: INTERNATIONAL HORTICULTURAL CONGRESS, 27., Belgium. **Anais...** Belgium: Acta Horticulturae, 2008. p. 279-286.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils - A review. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 2, p. 446-475, Feb. 2008.
- 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**, Oxford, v. 7, n. 2, p. 174-178, Mar. 2008.
- BINYAMINI, N.; SCHIFFMANN-NADEL, M. Latent infection in Avocado fruit due to *Colletotrichum gloeosporioides*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 62, p. 592-594, 1972.
- BROWN, G. E. Factors affecting postharvest development of *Colletotrichum gloeosporioides* in citrus fruits. **Phytopathology**, Saint Paul, v.65, p.404-409, 1975.
- CHAMEL INDÚSTRIA E COMÉRCIO DE PRODUTOS NATURAIS. **Óleos essenciais**. Campo Largo, 2010. Disponível em: <<http://www.chamel.com.br>>. Acesso em: 30 jan. 2010.
- CHEN, H. C.; SHEU, M. J.; WU, C. M. Characterization of volatiles in guava (*Psidium guajava* L. cv. Chung-Shan-Yueh-Pa) fruit from Taiwan. **Journal of Food and Drug Analysis**, Hoboken, v. 14, n. 4, p. 398-402, 2006.

CHU, C.-L.; LIU, W.-T.; ZHOU, T. Fumigation of sweet cherries with timol and acetic acid to reduce postharvest brown rot and blue mold rot. **Fruits**, Paris, v. 56, n. 2, p. 123-130, Mar./Apr. 2001.

CORATO, U. de. et al. Use of essential oil of *Laurus nobilis* obtained by means of a supercritical carbon dioxide technique against post harvest spoilage fungi. **Crop Protection**, Guildford, v. 29, n. 2, p. 142-147, Feb. 2010.

DAN, Y. et al. Activities of essential oils from *Asarum heterotropoides* var. *mandshuricum* against five phytopathogens. **Crop Protection**, Guildford, v. 29, n. 3, p. 295-299, Mar. 2010.

DAQUIOAG, V. R.; QUIMIO, T. H. Latent infection in mango caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. Philipp. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 15, p. 35-46, 1978.

DAYKIN, M.; MILHOLLAND, R. B. Histopathology of ripe rot caused by *Colletotrichum gloeosporioides* on muscadine grape. **Phytopathology**, St. Paul, v. 74, n. 11, p. 1339-1341, 1984.

ECKERT, J. W.; OGAWA, J. M. The chemical control of postharvest diseases: Subtropical and tropical fruits. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 23, p. 421-454, Dec. 1985.

EDRIS, A. E.; FARRAG, E. S. Antifungal activity of peppermint and sweet basil essential oils and their major aroma constituents on some plant pathogenic fungi from the vapor phase. **Nahrung: chemie, biochemie, mikrobiologie, technologie, ernahrung**, Berlin, v. 47, n. 2, p. 117-121, Apr. 2003.

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

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

INOUE, M. et al. Self-germination inhibitors from *Colletotrichum fragariae*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 22, n. 11, p. 2111-2122, Nov. 1996.

JARVIS, W. R. Latent infections in pre and postharvest environment. **Hortscience**, Alexandria, v. 29, n. 7, p. 749-751, July 1994.

KULAKIOTU, E. K.; THANASSOULOPOULOS, C. C.; SFAKIOTAKIS, E. M. Postharvest biological control of *Botrytis cinerea* on kiwifruit by volatiles of 'Isabella' grapes. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 94, n. 12, p. 1280-1285, Dec. 2004.

LEE, S. O. et al. Antifungal activity of five plant essential oils as fumigant against postharvest and soilborne plant pathogenic fungi. **Plant Pathology**, Oxford, v. 23, n. 2, p. 97-102, June 2007.

MARI, M.; BERTOLINI, P.; PRATELLA, G. C. Non-conventional methods for the control of post-harvest pear diseases. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 94, n. 5, p. 761-766, May 2003.

MELO, P. C. T. Da preocupação com a contaminação de frutas e hortaliças por resíduos de defensivos agrícolas, nasceu o SIRAH, sistema que permite monitorar a qualidade dos alimentos. **Cultivar HF**, Pelotas, v. 7, n. 37, p. 31, abr./maio 2006.

MING, L. C. Estudo e pesquisa de plantas medicinais na agronomia. **Horticultura Brasileira**, v. 12, n. 1, p. 3-9, maio 1994.

MOITA NETO, J. M.; MOITA, G. C. Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados. **Química Nova**, São Paulo, v. 21, n. 4, p. 467-469, 1998.

NERI, F. et al. Fungicidal activity of plant volatile compounds for controlling *Monilinia laxa* in stone fruit. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 91, n. 1 p. 30-35, Jan. 2007.

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, Mar. 2002.

PERFECT, S. E. et al. *Colletotrichum*: a model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 27, n. 2/3, p. 186-198, July 1999.

PLOTTO, A.; ROBERTS, D. D.; ROBERTS, R. G. Evaluation of plant essential oils as natural postharvest disease control of tomato (*Lycopersicon esculentum*). **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 628, p. 737-745, 2003.

PLOOY, W. du; REGNIER, T.; COMBRINCK, S. Essential oil amended coatings as alternatives to synthetic fungicides in citrus postharvest management. **Postharvest Biology and Technology**. v. 53, n. 3, p. 117-122, Sep. 2009.

PROGRAMA BRASILEIRO PARA A MELHORIA DOS PADRÕES COMERCIAIS E EMBALAGENS DE HORTIGRANJEIROS. Classificação da goiaba (*Psidium guajava* L.). Centro de Qualidade em Horticultura. CQH/CEAGESP. São Paulo. Fôlder. 2000.

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

RANASINGHE, L.; JAYAWARDENA, B.; ABEYWICKRAMA, K. Fungicidal activity of essential oils of *Cinnamomum zeylanicum* (L.) and *Syzygium aromaticum* (L.) Merr et L.M.Perry against crown rot and anthracnose pathogens isolated from banana. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 35, n. 3, p. 208-211, 2002.

RIEFLER, J.; NOVAK, J; KOSCHIER, E. H. Components of essential oils in plant protection. **Zeitschrift für Arznei- e Gewurzpflanzen**, Berlin, v. 14, n. 2, p. 70-76, June 2009.

ROCHE. Roche diagnostics GmbH. **Poly(oxyethylene)x-sorbitanemonolaurate, especially purified for membrane research**: Cat. No. 11 332 465 001. Mannheim, 2008. Disponível em: <<https://www.roche-applied-science.com/pack-insert/1332465a.pdf>>. Acesso em: 23 jan. 2010.

ROZWALKA, L. C. et al. Extratos, decoctos e óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas na inibição de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides* de frutos de goiaba. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 2, p. 31-36, mar./abr. 2008.

SALGADO, A. P. S. P. et al. Avaliação da atividade fungitóxica de óleos essenciais de folhas de *Eucalyptus* sobre *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* e *Bipolaris sorokiniana*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 2, p. 249-254, mar./abr. 2003.

SELA-BUURLAGE, M. B.; EPSTEIN, L.; RODRIGUEZ, R. J. Adhesion of ungerminated *Colletotrichum musae* conidia. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 39, n. 5, p. 345-352, Nov. 1991.

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, June, 2006.

SINGH, G. et al. The vapour action of essential oils and monoterpenoids against pathogenic fungi. **Sugar Tech Journal**, Amsterdam, v. 4, n. 1/2, p. 69-71, Jun. 2002.

SOARES, F. D. et al. Volatile and non-volatile chemical composition of the white guava fruit (*Psidium guajava*) at different stages of maturity. **Food Chemistry**, London, v. 100, n. 1, p. 15-21, 2007.

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

SOYLU, E. M.; SOYLU, S.; KURT, S. Antimicrobial activities of the essential oils of various plants against tomato late blight disease agent *Phytophthora infestans*. **Mycopathologia**, De Haag, v. 161, n. 2, p. 119-128, Feb. 2006.

STANGARLIN, J. R. et al. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, ano 2, n. 11, p. 16-21, nov./dez. 1999.

SUKATTA, U. et al. Antifungal activity of clove and cinnamon oil and their synergistic against postharvest decay fungi of grape *in vitro*. **Kasetsart Journal, (Natural Science)**, Bangkok v. 42, n. 5, p. 169-174, 2008.

SWINBURNE, T. R. Quiescent infections in post-harvest diseases. In: DENNIS, C. (ed.) **Post-harvest pathology of fruits and vegetables**, London: Academic p. 1-21, 1983.

TESKE, M.; TRENTINI, A. M. M. **Herbarium Compêndio de fitoterapia**. 3. ed. Curitiba: Herbarium Laboratório Botânico, 1997.

TRIPATHI, P.; DUBEY, N. K. Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 32, n. 3, p. 235-245, June 2004.

TRIPATHI, P. et al. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 20, n. 3, p. 317-321, Apr. 2004.

TRIPATHI, P.; SHUKLA, A. K. Application of essential oils for postharvest control of stem end rot of mango fruits during storage. **International Journal of Postharvest Technology and Innovation**, Olney, v. 1, n. 4, p. 405-415, 2009.

TZORTZAKIS N. G.; ECONOMAKIS, C. D. Antifungal activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus* L.) essential oil against key postharvest pathogens. **Innovative Food Science e Emerging Technologies**, Dublin, v. 8, n. 2, p. 253-258, June 2007.

TZORTZAKIS, N. G. Impact of cinnamon oil-enrichment on microbial spoilage of fresh produce. **Innovative Food Science e Emerging Technologies**, Dublin, v. 10, n. 1, p. 97-102, Jan. 2009.

VANDERPLANK, J. E. **Plant Diseases: Epidemics and Control**. New York. Academic. 1963.

VERHOEFF, K. Latent infections by fungi. **Annual Review of Phytopathology**, v. 12, p. 99-110, 1974.

WISNIEWSKI, M. E.; WILSON, C. L. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: Recent advances. **Hortscience**, Alexandria, v. 27, n. 2, p. 94-98, Feb. 1992.

CAPÍTULO 4

Estudos ultraestruturais das ações de película de fécula de mandioca e de óleos essenciais em frutos de goiabeira sobre *Colletotrichum gloeosporioides* e de óleos essenciais sobre conídios do patógeno

RESUMO

O presente trabalho foi realizado com os objetivos de estudar o processo de infecção e reprodução de *C. gloeosporioides* em goiabas; verificar o efeito de película à base de fécula de mandioca e de óleos essenciais nas fases de contato e vapor sobre os eventos de pré-penetração e reprodução do patógeno em goiabas, por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV), além de avaliar o efeito dos óleos essenciais de *Cymbopogon martinii*, *Eugenia caryophyllata*, *Cinnamomum* sp., *Thymus vulgaris* e *Cymbopogon citratus* sobre conídios de *C. gloeosporioides*, por meio de microscopia eletrônica de transmissão (MET). Em áreas demarcadas na epiderme de goiabas cortadas em pedaços, de goiabas inteiras recobertas e não com película à base de fécula de mandioca, foi feita a inoculação de suspensão de conídios de *C. gloeosporioides*. Um grupo de goiabas inoculadas foi exposto aos vapores dos óleos essenciais de canela, erva-baleeira, capim-limão, cravo-da-índia, menta, atroveran, orégano, erva-doce e tomilho, depositados nas tampas das embalagens plásticas. As amostras foram coletadas em 6, 12, 24, 48, 72, 96 e 120 horas após a inoculação, fixadas em Karnovsky modificado e, após 24 horas, submetidas ao protocolo de preparo de amostras para MEV. A observação e o registro das imagens foram realizados no microscópio Leo Evo 40. Conídios, em suspensão preparada em água destilada e esterilizada com Tween 20% a 1,0%, foram tratados com os óleos essenciais a 0,5%, permanecendo sob agitação a 25°C, por 24 horas. Após centrifugação e descarte do sobrenadante, as massas de conídios obtidas foram fixadas em Karnovsky modificado por 24 horas. As suspensões foram novamente centrifugadas e, após o descarte do sobrenadante, os conídios fixados foram emblocados em gel de agarose e submetidos ao protocolo de preparo de amostras para MET. Por meio de MEV, foi possível observar a importância dos apressórios como estruturas de pré-penetração para o estabelecimento da infecção de *C. gloeosporioides* em goiabas. A película à base de fécula de mandioca estimulou a formação de apressórios, contribuindo para o sucesso do processo de infecção do patógeno. Entretanto, limitou a colonização dos tecidos dos frutos de goiabeira e a reprodução do patógeno. O óleo essencial de *T. vulgaris* promoveu mudança estrutural nas hifas, podendo vir a ser utilizado como um biofumigante natural no controle de antracnose em pós-colheita. Nas imagens obtidas no microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 109, observou-se que *C. martinii*, *E. caryophyllata*, *T. vulgaris*, *C. citratus* e *Cinnamomum* sp. apresentaram ação fungitóxica direta sobre os conídios de *C. gloeosporioides*, causando severos danos aos mesmos e promovendo a desorganização e a degradação celular, que podem inviabilizar a germinação.

Palavras-chave: Histopatologia. Modo de ação. Atividade antifúngica. Microscopia eletrônica de varredura. Microscopia eletrônica de transmissão.

ABSTRACT

The present study had as objectives, to study the infection and reproduction process of *C. gloeosporioides* in guavas; to verify the cassava starch pellicle (coating) and essential oil effect in the steam and contact phases on the pre-penetration events and reproduction of the pathogen in guavas through scanning electron microscopy (SEM) and to evaluate the effect of the essential oils of *Cymbopogon martinii*, *Eugenia caryophyllata*, *Cinnamomum sp.*, *Thymus vulgaris* and *Cymbopogon citratus* on conidia of *C. gloeosporioides* through transmission electron microscopy (TEM). The inoculation of *C. gloeosporioides* conidia suspension was conducted in areas demarcated in the epidermis of cut guava pieces and whole guavas coated and not coated with cassava starch biofilm. A group of inoculated guavas was exposed to the steam of the essential oils of cinnamon, baleeira herb; lemon grass; Indian clove; mint; atroveran; oregano; anise and thyme, deposited on the covers of plastic packagings. The samples were collected at 6, 12, 24, 48, 72, 96 and 120 hours after the inoculation, fixed in modified Karnovsky and after 24 hours submitted to the SEM sample preparation protocol. The observation and the registration of the images were accomplished in a Leo Evo 40 microscope. Conidia, in suspension prepared in distilled, sterilized water with 1.0% Tween 20, were treated with the essential oils at 0.5% staying under agitation at 25 °C, for 24 hours. After centrifugation and discard of the supernatant, the mass of conidia obtained were fixed in modified Karnovsky for 24 hours. The suspensions were centrifuged again and after the discard of the supernatant, the fixed conidia were embedded in agarose gel and submitted TEM sample preparation protocol. Through SEM it was possible to observe the importance of the appressoria as pre-penetration structures for the establishment of *C. gloeosporioides* infection of in guava fruits. The cassava starch based biofilm stimulated the appressoria formation, contributing to the success of the pathogen infection process, however, it limited the colonization of the guava fruits tissues and the reproduction of the pathogen. The essential oil of *T. vulgaris* promoted structural change in the hyphae of *C. gloeosporioides* being able to be used as a natural biofumigant in the postharvest anthracnose control. In the images obtained in the Zeiss Transmission Electron Microscope EM 109, it was observed that *C. martinii*, *E. caryophyllata*, *T. vulgaris*, *C. citratus* and *Cinnamomum sp.* presented direct fungitoxic action on the conidia of *C. gloeosporioides* causing their severe damage, promoting the disorganization and cellular degradation that can make germination unfeasible.

Keywords: Histopathology. Action mechanisms. Antifungal activity. Transmission electron microscopy. Scanning electron microscopy.

1 INTRODUÇÃO

A antracnose, causada por *Colletotrichum gloeosporioides* em frutos tropicais, como abacate, goiaba, mamão, manga e maracujá, constitui um problema importante em pós-colheita (PERES et al., 2002). Em todos os países produtores de frutos de goiabeiras, a antracnose destaca-se como a doença mais comum em pré e em pós-colheita, podendo causar consideráveis perdas em pós-colheita (LIM; MANICON, 2003).

No Brasil, a antracnose, ou mancha-chocolate, causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penzig) Arx (= *Gloeosporium psidii* Delacr.), cuja forma sexuada corresponde a *Glomerella cingulata* (Stonem) Spauld e Schrenk, apresenta-se como uma das doenças mais graves em pós-colheita de frutos de goiabeira (GORGATTI NETTO et al., 1996).

Dentre as possibilidades para o controle alternativo de doenças em pós-colheita, representando menor risco para a saúde humana e para o ambiente, atendendo aos preceitos para a prática da agricultura alternativa (ZADOKS, 1992), destaca-se a utilização de produtos naturais obtidos de plantas (KULAKIOTU; THANASSOULOPOULOS; SFAKIOTAKIS, 2004), como, por exemplo, a exploração da atividade antifúngica de óleos essenciais (BAKKALI et al., 2008).

Embora, na literatura, existam vários relatos sobre a eficiência de óleos essenciais no controle de doenças, poucos abordam o modo de ação desses sobre os fitopatógenos (CHANG; LIN; LEU, 1987; ZAMBONELLI et al., 1996; CHANG; ROUTREE; LEU, 2000; SOYLU; SOYLU; KURT, 2006; RASOOLI; REZAEI; ALLAMEH, 2006; SHARMA; TRIPATHI, 2006; ARROYO et al., 2007; FERREIRA et al., 2009) e a maioria é realizada em meios microbiológicos (*in vitro*), o que impossibilita a elucidação da interação patógeno-hospedeiro. Diante da complexidade dos óleos essenciais, admite-se

que existem vários mecanismos de ação, porém, ainda não conhecidos exatamente, podendo, então, a inibição de patógenos ocorrer pela desnaturação de proteínas, a inibição de enzimas e/ou a desintegração de membranas (JANSSEN, 1989).

Os filmes e as coberturas essencialmente compostos por amido (RÓZ et al., 2001), que têm suscitado interesse considerável para a manutenção da qualidade pós-colheita em relação às características físicoquímicas, principalmente, à base de fécula de mandioca (HENRIQUE; CEREDA, 1999; OLIVEIRA; CEREDA, 1999; DAMASCENO et al., 2003; MACIEL et al., 2004; REIS et al., 2006; PEREIRA et al., 2006), apresentam-se como outra possibilidade pois o controle de fitopatógenos. Porém, a inibição do crescimento microbiano pelas películas, mencionada por Leistner e Gorris (1995), está incutida nos resultados e não claramente elucidada.

Para a elucidação da interação patógeno-hospedeiro e do modo de ação dos óleos essenciais sobre a morfologia de patógenos, a microscopia eletrônica de varredura (MEV) e a microscopia eletrônica de transmissão (MET) apresentam-se como importantes ferramentas, pois permitem a observação das alterações estruturais e ultraestruturais, respectivamente, sobre membrana plasmática, citoplasma (coagulação, vacuolização, extravasamento), núcleos e outras organelas, e sobre conídios, estruturas de infecção e hifas (colapsamento, enrugamento) e a visualização dos eventos de infecção (pré-penetração: adesão, germinação, e em alguns casos, formação de apressórios, penetração e estabelecimento das relações parasitárias), colonização e reprodução, bem como as reações das plantas aos patógenos (ALVES et al., 2008).

A ultraestrutura de fungos (BUCKLEY; SJAHOLM; SOMMER, 1966; BECKETT; HEATH; MCLAUGHLIN, 1974; LITTLEFIELD e HEALTH, 1979) e a interação patógeno-hospedeiro (MAEDA, 1970; CHAU; ALVAREZ, 1983; CHANG; LIN; LEU, 1987; CHANG:ROUTREE; LEU, 2000;

FERREIRA et al., 2009) estão bem documentadas na literatura, ao contrário da ultraestrutura do modo de ação de produtos sobre patógenos, que apresenta número reduzido de trabalhos já publicados (ZAMBONELLI et al., 2004, RASOOLI; REZAEI; ALLAMEH, 2006; SVIRCEV et al., 2007; ARROYO et al., 2007; SOYLU et al., 2007).

Diante do exposto, o presente trabalho foi realizado com os objetivos de estudar o processo de infecção (pré-penetração) e reprodução de *Colletotrichum gloeosporioides* em frutos de goiabeira (*Psidium guajava* L.); verificar o efeito de película à base de fécula de mandioca e de óleos essenciais nas fases de contato de vapor sobre os eventos de pré-penetração e reprodução de *Colletotrichum gloeosporioides* em frutos de goiabeira por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e avaliar o efeito de óleos essenciais sobre a ultraestrutura de conídios de *Colletotrichum gloeosporioides* por meio de microscopia eletrônica de transmissão (MET).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local

Os experimentos, o preparo das amostras, as observações e o registro das imagens em microscópio eletrônico de varredura (MEV) e microscópio eletrônico de transmissão (MET) foram realizados no Laboratório de Microscopia e Análise Ultraestrutural (LME) no Departamento de Fitopatologia (DFP) da Universidade Federal de Lavras, MG, no período de outubro a dezembro de 2009.

2.2 Efeito de compostos fixos e voláteis de óleos essenciais e película à base de fécula de mandioca sobre infecção de *Colletotrichum gloeosporioides* em frutos de goiabeira por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV)

2.2.1 Obtenção e preparo dos frutos de goiabeira (*Psidium guajava*, L.)

Para avaliação do efeito de óleos essenciais sobre infecção de *C. gloeosporioides*, frutos verdes de goiabeira (*Psidium guajava*, L., cv. Pedro Sato) foram colhidos no pomar comercial da Fazenda Pasto Fechado, situada a 877 m de altitude, 21°13'30,77" latitude Sul e 44°59'06,01" longitude Oeste, na cidade de Lavras, MG.

Os frutos foram submetidos à lavagem em água corrente (2 minutos), desinfestação em hipoclorito de sódio a 1% (NaClO), durante 3 minutos e lavagem em água destilada.

2.2.2 Estudo dos eventos de pré-penetração e reprodução de *Colletotrichum gloeosporioides* em frutos de goiabeira tratados ou não com película à base

de fécula de mandioca (2%)

O experimento realizado em duas etapas, inicialmente, visou o conhecimento do processo pré-penetração e reprodução de *C. gloeosporioides* em frutos de goiabeira. Posteriormente, objetivou-se avaliar o efeito da película à base de fécula de mandioca (2%) sobre esse processo de infecção, em comparação aos frutos não tratados.

2.2.2.1 Estudo dos eventos de pré-penetração e reprodução de *Colletotrichum gloeosporioides* em frutos de goiabeira por meio de microscopia eletrônica de varredura

Após a desinfestação descrita no item 2.3.1, os frutos foram secos com papel toalha, cortados ao meio para extração da polpa e o pericarpo cortado em pedaços de 2,0 x 2,0 x 0,2 cm. Áreas circulares de 0,5 cm de diâmetro foram demarcadas na epiderme para inoculação de 20 µL da suspensão de conídios de *C. gloeosporioides* na concentração de $7,0 \times 10^6$ conídios.mL⁻¹, proveniente de culturas com 30 dias. As amostras foram incubadas em câmara úmida, à temperatura ambiente média de 23°C.

Nas áreas previamente demarcadas, as amostras devidamente identificadas foram coletadas com um cortador de discos de 0,5 cm de diâmetro às 6, 12, 24, 48 e 96 horas após a inoculação e preparadas para microscopia eletrônica de varredura, conforme metodologia descrita no item 2.3.5.

2.2.2.2 Efeito da película à base de fécula de mandioca (2%) sobre os eventos de pré-penetração e reprodução de *Colletotrichum gloeosporioides* em frutos de goiabeira, por meio de microscopia eletrônica de varredura

Após a desinfestação descrita no item 2.3.1, os frutos foram secos com papel toalha e inoculados, com 20 µL da suspensão de conídios de *C.*

gloeosporioides, na concentração de 1×10^4 conídios.mL⁻¹, proveniente de cultura monospórica, em áreas circulares de 0,5 cm de diâmetro previamente demarcadas na epiderme. As amostras foram incubadas em câmara úmida (73 a 88%), à temperatura ambiente média de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, sob fotoperíodo de 12 horas.

Nas áreas previamente demarcadas, as amostras devidamente identificadas foram coletadas com cortador de discos de 0,5 cm de diâmetro às 6, 12, 24, 48, 72, 96 e 120 horas após a inoculação e preparadas para microscopia eletrônica de varredura, conforme metodologia descrita no item 2.3.5.

2.2.2.3 Efeito de óleos essenciais sobre os eventos de pré-penetração de *Colletotrichum gloeosporioides* em frutos de goiabeira por meio de microscopia eletrônica de varredura

Alíquotas de 200 µL dos tratamentos contendo óleos essenciais de *Lavandula officinalis* (alfazema), *Ocimum selloi* (atroveran), *Origanum vulgare* (orégano), *Cinnamomum* sp. (canela), *Laurus nobilis* (louro), *Thymus vulgaris* (tomilho), *Lippia citriodora* (cidrão), *Cordia verbenacea* (erva-baleeira), *Cymbopogon citratus* (capim-limão), *Eugenia caryophyllata* (cravo-da-índia), *Citrus sinensis* (laranja-doce), *Pimpinella anisum* (erva-doce), *Citrus limon* (limão Siciliano), *Rosmarinus officinalis* (alecrim), *Chamaecyparis plumosa* (tuia-áurea), *Matricaria recutita* (camomila), *Zingiber officinale* (gengibre), *Cymbopogon martinii* (palmarosa), *Eucalyptus citriodora* (eucalipto), *Ocimum basilicum* (manjeriço), *Melaleuca alternifolia* (melaleuca), *Eucalyptus globulus* (eucalipto), *Mentha arvensis* (menta), *Chamaecyparis psifera* (tuia Europa) e *Baccharis dracunculifolia* (alecrim-do-campo), na concentração de 0,2% (2.000 µL.L⁻¹) e 200 µL da suspensão de conídios (1×10^5 conídios.mL⁻¹), foram depositadas nos orifícios de placas de Elisa, sendo obtida a concentração de

0,1% ($1000 \mu\text{L.L}^{-1}$). Para o controle, 200 μL da suspensão de conídios foram misturados a 200 μL de água destilada e esterilizada.

Após desinfestação como descrito 2.3.1, os frutos verdes de goiabeira secos com papel toalha foram cortados em pedaços de 3,0 x 3,0 x 0,5 cm e inoculados com 20 μL dos tratamentos contendo os óleos essenciais acima citados, em áreas circulares de 0,5 cm de diâmetro previamente demarcadas na epiderme e incubados em câmara úmida, à temperatura ambiente de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Nas áreas previamente demarcadas, as amostras foram coletadas 48 horas após a inoculação e preparadas para MEV, conforme metodologia descrita no item 2.3.5.

2.2.2.4 Efeito de compostos voláteis de óleos essenciais e película à base de fécula de mandioca sobre os eventos de pré-penetração e reprodução de *Colletotrichum gloeosporioides* em frutos de goiabeira por meio de microscopia eletrônica de varredura

Após desinfestação como descrito 2.3.1 e secagem natural, os frutos verdes de goiabeira foram inoculados com suspensão de esporos (1×10^5 conídios. mL^{-1}) de *C. gloeosporioides*, em 5 pontos equidistantes.

Para evitar escorrimento do inóculo, os frutos permaneceram sobre a bancada até deposição completa e, então, foram numerados e acondicionados em embalagens plásticas com volume médio de 2080 cm^3 .

Os tratamentos consistiram na exposição dos frutos aos compostos voláteis dos óleos essenciais de canela, *Cordia verbenacea*, capim-limão, cravo-da-índia, menta, atroveran, orégano, erva-doce e tomilho, selecionados mediante verificação de inibição total do crescimento micelial do patógeno, *in vitro* (Capítulo 2).

Nas tampas das embalagens plásticas, internamente, foram fixados três

círculos de papel de filtro equidistantemente e alíquotas de, aproximadamente, 6,67 μL dos óleos essenciais foram pipetadas sobre esses, totalizando 20 μL por embalagem ou 0,009615 $\mu\text{L}\cdot\text{cm}^{-3}$, volume 97,71% inferior ao utilizado nos testes *in vitro* (Capítulo 2).

Nas embalagens contendo os frutos do controle foram pipetadas alíquotas de aproximadamente 6,67 μL de água sobre os três círculos de papel de filtro, totalizando 20 μL por embalagem. Para a obtenção de câmara úmida, um recipiente contendo algodão umedecido com 100 mL de água foi colocado em cada embalagem.

As embalagens contendo três frutos foram reabertas 72 horas após o tratamento, aproximadamente, para a coleta das amostras que foram preparadas para microscopia eletrônica de varredura, conforme metodologia descrita no item 2.3.5.

2.2.2.5 Preparo das amostras para microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para a realização da microscopia eletrônica de varredura (MEV), as amostras foram fixadas em Karnovsky modificado, composto por glutaraldeído a 2,5%, formaldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio a 0,05 M, pH 7,2, e cloreto de cálcio (CaCl_2) a 0,001 M e mantidas em geladeira, por um período mínimo de 24 horas (fixação primária ou pré-fixação).

Em capela, as amostras pré-fixadas foram lavadas 3 vezes, por 10 minutos, em tampão cacodilato de sódio a 0,05 M, para pós-fixação em tetróxido de ósmio (OsO_4) a 2%. Após o período de 2 horas, as amostras foram lavadas em água destilada (3 vezes) e submetidas à desidratação em série crescente de acetona, nas concentrações de 25%, 50%, 75%, 90% e 100%. As amostras permaneceram por dez minutos em cada concentração, exceto em acetona a

100%, cuja desidratação foi realizada em três tempos de dez minutos.

O processo de secagem (substituição da acetona por CO₂) das amostras desidratadas foi realizado em aparelho de ponto crítico BAL-TEC CPD 030.

Os espécimes obtidos foram fixados com fita dupla-face de carbono em suportes metálicos (stubs de alumínio) revestidos com papel alumínio, submetidos ao processo de metalização (*sputtering*) com ouro (banho de ouro), em aparelho BAL-TEC SCD 050 e armazenados em dessecador contendo sílica-gel e observados, posteriormente, em microscópio Leo Evo 40.

2.2.2.6 Efeito de óleos essenciais sobre ultraestrutura de *Colletotrichum gloeosporioides* por meio de microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Para a avaliação do modo de ação de óleos essenciais sobre ultraestrutura de *C. gloeosporioides*, conídios foram submetidos aos tratamentos contendo os óleos essenciais de canela, capim-limão, cravo-da-índia, palmarosa e tomilho selecionados, em função do potencial de inibição total (100%) sobre a germinação desses patógenos, nas concentrações de 0,1% e 0,5%, verificado em experimento anterior.

Em tubos de ensaio, 0,5 mL das suspensões de conídios do fungo (1×10^{10} conídios.mL⁻¹) preparadas em água destilada e esterilizada com Tween 20 a 1,0% foram misturadas a 0,5 mL das soluções a 1,0% de óleos essenciais para a obtenção de concentração final a 0,5%. Para o controle, 0,5 mL das suspensões de esporos foram misturados a 0,5 mL de água destilada e esterilizada.

Os tratamentos permaneceram sob agitação em Shaker Orbital, na rotação de 100 rpm e temperatura média de 25°C. Após 24 horas, os tratamentos foram transferidos para Eppendorfs e centrifugados, por 3 minutos, a 6.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e as massas de esporos fixadas em Karnovsky modificado composto por glutaraldeído a 2,5%, formaldeído a 2,5% em tampão

cacodilato de sódio a 0,05 M, pH 7,2 e cloreto de cálcio (CaCl_2) a 0,001 M e mantidas em geladeira por 24 horas (fixação primária ou pré-fixação).

Para a formação de *pellets* de conídios, após centrifugação por 3 minutos a 6.000 rpm e descarte do sobrenadante composto pelo fixador, o gel de agarose a 1,0% aquecido a 45°C, aproximadamente, foi misturado à massa de conídios com palito de dente, solidificando instantaneamente e cortado em blocos. As amostras foram, então, preparadas para a microscopia eletrônica de transmissão.

Em capela, os blocos de agarose pré-fixados foram lavados 3 vezes, por 10 minutos, em tampão cacodilato de sódio a 0,05 M, para pós-fixação em tetróxido de ósmio (OsO_4) a 2%. Após o período de 2 horas, os blocos foram lavados em água destilada (3 vezes) e submetidos à contrastação em bloco ou fixação complementar para a preservação das membranas com acetato de uranila a 0,5%, por uma noite, em geladeira.

Para a retirada da água dos blocos, a desidratação foi feita em série crescente de acetona, nas concentrações de 25%, 50%, 75%, 90% e 100%, durante 10 minutos em cada, exceto em 100%, com 3 tempos de 10 minutos.

Posteriormente, os blocos foram submetidos ao processo de inclusão, embebição ou infiltração, sendo a acetona substituída por resina em gradiente crescente, permanecendo 8 horas em resina Spurr (30%) e acetona (70%), 8 horas em resina Spurr (70%) e acetona (30%) e 2 vezes de 12 horas em resina Spurr (100%) em temperatura ambiente.

Em moldes (formas) de silicone previamente preparados, contendo metade do volume com resina Spurr (100%) endurecida, as amostras cortadas ao meio foram acondicionadas e recobertas com resina Spurr (100%), permanecendo em estufa a 70°C, por 48 horas, para a polimerização ou cura.

Para reduzir a superfície de corte, eliminar o excesso de resina e obter uma mesa de corte trapezoidal com base de aproximadamente 2,0 mm, foi feito o desbaste dos blocos com lâminas de barbear.

Inicialmente, cortes semifinos (0,5 μm) foram feitos em ultramicrotomo Reichert-Jung (Ultracut E), com navalha de vidro para a localização das estruturas fúngicas de interesse em microscópio de luz e orientação dos cortes ultrafinos. Os cortes semifinos coletados com anel de ouro e colocados em lâminas de vidro foram secos em chapa a, aproximadamente, 60°C, recobertos com azul de toluidina (1g de azul de toluidina, 1g de borato de sódio e 100 mL de água, filtrado em filtro Millipore 0,2 μm), aquecidos em chapa até a formação de borda dourada, lavados em água destilada, secos em chapa quente e visualizados em microscópio de luz.

Em seguida, os cortes ultrafinos (>100 nm) foram feitos com navalha de diamante, coletados em grades de cobre previamente recobertas com película de formvar, pós-contrastados com acetato de uranila (2%) e citrato de chumbo (3%) por 3 minutos em cada e lavados em água destilada.

A observação das amostras e o registro de imagens foram realizados em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 109 a 80 Kv.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Eventos de pré-penetração e reprodução de *Colletotrichum gloeosporioides* em frutos de goiabeira observados por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Pela análise das imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV), observou-se que a germinação de conídios de *C. gloeosporioides* com formação de tubos germinativos na epiderme dos frutos de goiabeira ocorreu nas primeiras seis horas após a inoculação (Figura 1A). A formação de apressórios iniciou-se 12 horas após a inoculação (Figura 1B) e desenvolvimento completo após o período de 24 horas (Figura 1C). Não foi observado o crescimento de tubos germinativos em direção aos estômatos (Figura D). O início da formação dos acérvulos nos estômatos ou no rompimento da cutícula foi observado 48 horas após a inoculação (Figuras E e F). A reprodução assexuada foi caracterizada pela presença de conídios formados sobre conidióforos e no interior dos acérvulos envoltos por matriz mucilaginosa, 96 horas após a inoculação (Figura G). Essa matriz mucilaginosa constitui-se de polissacarídeos e proteínas solúveis em água que, provavelmente, os protege da dessecação e aumenta a eficiência de germinação e penetração no tecido hospedeiro (PERFECT et al., 1999). Em 96 horas, o patógeno colonizou a epiderme do fruto, produzindo estruturas de reprodução (Figura H).

No gênero *Colletotrichum*, o início de germinação apresenta-se altamente variável, podendo ocorrer entre 3 e 48 horas (LOPEZ, 2001). Ceras e etileno, produzidos pela planta hospedeira, desencadeiam a germinação de conídios em espécies de *Colletotrichum* (OSHEROV; MAY, 2001), como também a dureza da superfície (RUAN; KOTRAIAH; STRANEY, 1995; KIM; LI; KOLATTUKUDY, 1998) possivelmente determina tal variação. Em folhas

de café (*Coffea arabica* L.), Ferreira et al. (2009) observaram que os conídios de *C. gloeosporioides* dos isolados de folhas de cafeeiro e mangueira germinaram entre seis e oito horas, após a inoculação. Chang, Lin e Leu (1987) e Chang, Routree e Leu (2000) verificaram que a germinação de *Colletotrichum musae* ocorreu entre 6 e 12 horas e 8 horas após a inoculação em banana madura e verde, respectivamente.

Embora as cavidades dos estômatos constituam porta de entrada para inúmeros patógenos, observou-se que *C. gloeosporioides* utilizou os apressórios como estratégia de infecção na penetração do hospedeiro.

Os apressórios foram apresentados como estruturas de infecção por Binyamini e Schiffmann-Nadel (1972) em abacate, por Brown (1975) em laranja, por Daquiaoag e Quimio (1978) em manga e por Simonds (1941) e Chau e Alvarez (1983) em mamão. Brown (1975) relatou que raramente foi observado o crescimento de tubos germinativos de *C. gloeosporioides* direcionado aos estômatos, em citros.

Na elucidação da interação planta-patógeno, evidenciou-se a importância dos apressórios como uma estrutura de pré-penetração para o estabelecimento da infecção de *C. gloeosporioides* em frutos de goiabeira.

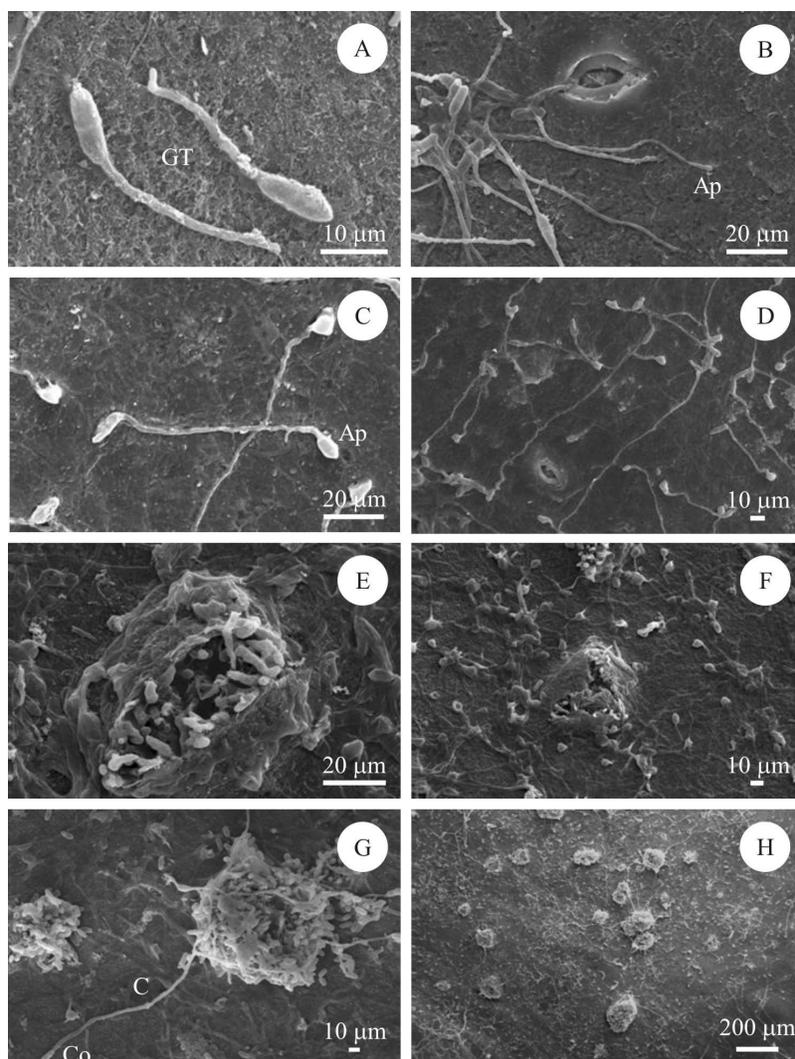


Figura 1 Eletromicrografia de varredura do processo de pré-penetração de *Colletotrichum gloeosporioides* em frutos de goiabeiras (*Psidium guajava* L.). A. Germinação - formação de tubos germinativos (GT), seis horas após inoculação. B. Início da formação de apressório (Ap), 12 horas após inoculação. C. Apressórios formados (Ap), 24 horas após inoculação. D. Pré-penetração via apressórios, 24 horas após inoculação. E. Início da formação de acérvulos nos estômatos, 48 horas após a inoculação. F. Rompimento da cutícula, 48 horas após a inoculação. G. Acérvulos formados, com conidióforo (C) e conídio (Co), 96 horas após inoculação. H. Epiderme do fruto colonizada, 96 horas após a inoculação.

3.2 Efeito da película à base de fécula de mandioca (2%) sobre os eventos pré-penetração e reprodução de *Colletotrichum gloeosporioides* em frutos de goiabeira, por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Por meio da microscopia eletrônica de varredura, foi possível observar a interferência da película à base de fécula de mandioca (2%) sobre os eventos de germinação e pré-penetração no processo de infecção de *C. gloeosporioides* em frutos de goiabeira.

No controle e em presença da película, seis horas após a inoculação, os conídios não haviam iniciado o processo de germinação. Em alguns conídios do controle, foi observado material extracelular adesivo (Figura 2A). Em presença da película, observou-se conídio germinado colapsado e conídio não germinado com aspecto deformado (Figura 2B).

Conídios com tubos germinativos ramificados, compridos e com reduzida emissão de apressórios, foram observados no controle, 24 horas após a inoculação (Figura 2C). Entretanto, sobre a película, observou-se intensa formação de apressórios em conídios com tubos germinativos curtos (Figura 2D).

Para *C. gloeosporioides* e outras espécies do gênero, o contato com uma superfície dura se faz necessário, para desencadear eventos moleculares e sinalização química que induzem a germinação (RUAN; KOTRAIAH; STRANEY, 1995; KIM; LI; KOLATTUKUDY, 1998) e diferenciação de apressórios (KIM; LI; KOLATTUKUDY, 1998; LIU; KOLATTUKUDY, 1998). Com base no exposto, supõe-se que a resistência à perfuração apresentada pela película comportou-se como uma superfície dura, estimulando a formação de apressórios.

Crescimento micelial abundante sobre a superfície dos frutos do controle foi observado 48 horas após a inoculação, enquanto, sobre a superfície coberta, foram observadas algumas hifas rompendo a película, provavelmente originadas

a partir das cavidades dos estômatos.

O rompimento da cutícula, a liberação e a germinação de conídios, inclusive com formação de apressórios, foram observados 48 e 72 horas após a inoculação, no controle e em presença da película, respectivamente (Figuras 2E e 2F). Além de o rompimento da cutícula ter ocorrido 24 horas depois do controle, nos frutos cobertos com a película, observou-se o colapsamento dos conídios liberados.

Foi possível observar o crescimento micelial do patógeno sob a película e o rompimento da película pelos tubos germinativos em determinados pontos, a partir de 72 e 96 horas após a inoculação (Figuras G e H).

O rompimento da película observado em vários pontos pelos tubos germinativos do patógeno, 72 horas após a inoculação (Figura 2G), pode ser atribuído a algum problema durante o processo de gelatinização, caracterizado pela presença dos grânulos de fécula de mandioca. Na superfície contínua sem presença de grânulos, observou-se maior resistência à perfuração pelos tubos germinativos, atrasando o desenvolvimento do patógeno, 96 horas após a inoculação (Figura 2H).

Diante dessas observações, concluiu-se que, embora a película tenha estimulado a formação dos apressórios, contribuindo para o sucesso do processo de infecção de *C. gloeosporioides*, ela limitou a colonização dos tecidos dos frutos de goiabeira e a reprodução do patógeno, apresentando-se como uma barreira eficiente que impede o desenvolvimento do patógeno e a formação das lesões típicas de antracnose. É, portanto, uma ferramenta útil a ser utilizada no controle alternativo de doenças em pós-colheita, como observado no Capítulo 3.

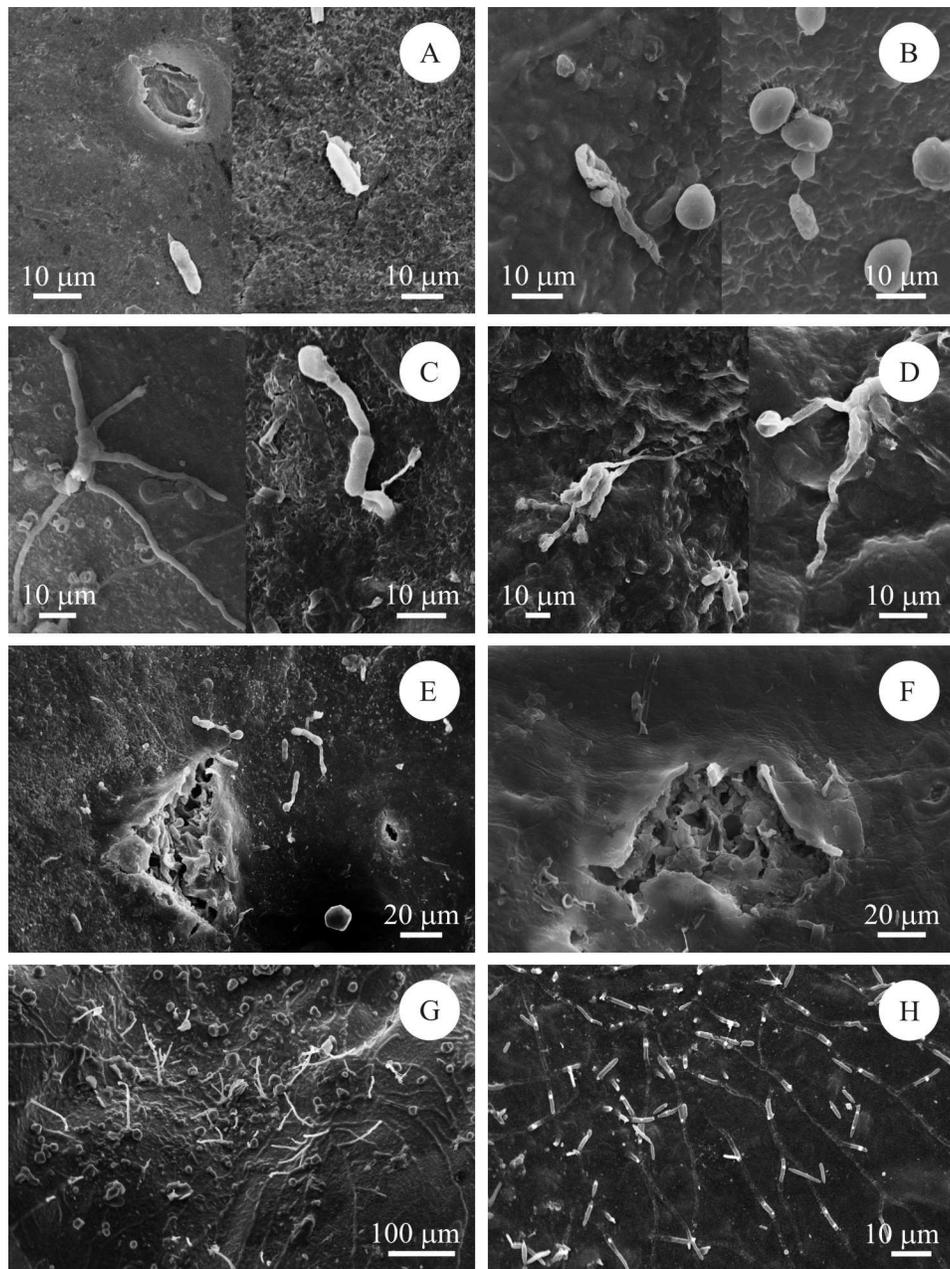


Figura 2 Eletromicrografia de varredura de infecção de *Colletotrichum gloeosporioides* em frutos de goiabeiras (*Psidium guajava* L.) revestidos ou não com película à base de fécula de mandioca a 2,0%. A. Conídios não germinados no controle, 6 horas após inoculação. B.

Conídio germinado colapsado e conídio não germinado com aspecto deformado sobre a película, seis horas após inoculação. C. Tubos germinativos ramificados, compridos e emissão de apressórios reduzida no controle, 24 horas após a inoculação. D. Elevada formação de apressórios em conídios com tubos germinativos curtos sobre a película, 24 horas após inoculação. E. Rompimento da cutícula, liberação e germinação, formação de apressórios no controle, 48 horas após a inoculação. F. Rompimento da cutícula e película, liberação e germinação, formação de apressórios, 72 horas após a inoculação. G. Rompimento da película pelos tubos germinativos, 72 horas após a inoculação. H. Resistência da película à perfuração pelos tubos germinativos, atrasando o desenvolvimento do patógeno, 96 horas após a inoculação.

3.3 Óleos essenciais sobre os eventos pré-penetração de *Colletotrichum gloeosporioides* em frutos de goiabeira, por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Considerando-se a possibilidade de ocorrer fitotoxidez nos frutos de goiabeira e supostamente reduzir os custos de aplicação do tratamento em pós-colheita, decidiu-se pela utilização de alguns óleos numa concentração inferior à potencialmente fungitóxica observada *in vitro*, como apresentado no Capítulo 2.

Dessa forma, os óleos essenciais de manjerição, erva-doce, menta, camomila, erva-baleeira, louro e orégano, que inibiram totalmente a germinação de conídios de *C. gloeosporioides* a 0,5% (5000 $\mu\text{L.L}^{-1}$), *in vitro*, foram utilizados a 0,1% (5000 $\mu\text{L.L}^{-1}$). Tal redução foi desnecessária para os óleos essenciais de palmarosa, cravo-da-índia, tomilho e capim-limão e canela, pois demonstraram potencial fungitóxico a 0,1% (1000 $\mu\text{L.L}^{-1}$).

Também foram testados os óleos essenciais de tuia-áurea, tuia-europa, alecrim, eucalipto, limão-siciliano, laranja-doce, cidrão e melaleuca, que não apresentaram atividade antifúngica, comparando-se à testemunha e os óleos essenciais de atoveran, alecrim-do-campo, gengibre, eucalipto (*Eucalyptus globulus*) e alfazema, que promoveram a inibição parcial do patógeno.

Nos pedaços de frutos de goiabeira do controle, inoculados com suspensão de conídios de *C. gloeosporioides* (1×10^5 conídios.mL⁻¹), observaram-se, além do crescimento micelial abundante, conídios germinados com tubos germinativos longos, conídios com tubos germinativos ramificados e apressórios formados nas extremidades e ruptura da epiderme do fruto, 48 horas após a inoculação (Figura 3).

Nenhum óleo essencial utilizado nesse experimento apresentou capacidade de inibir totalmente a germinação dos conídios de *C. gloeosporioides*. Entretanto, nos tratamentos com óleos essenciais de canela, eucalipto (*Eucalyptus globulus*), cravo-da-índia, alfazema e manjeriço, foi observado o maior número de conídios não germinados. O óleo essencial de menta praticamente inibiu a germinação dos conídios, pois, 48 horas após a inoculação, os tubos germinativos apresentavam tamanho inferior ao diâmetro dos conídios.

Com exceção do controle, apressórios raramente foram observados nos demais tratamentos. Essa informação é de grande relevância, considerando-se a função dos apressórios no processo de infecção de *C. gloeosporioides* que penetra nos frutos ainda verdes de várias espécies vegetais, permanecendo latente ou inativo até o amadurecimento, quando, devido à colonização, observa-se grande quantidade de lesões (AMORIM, 1995). Assim, pode-se inferir que a aplicação dos óleos essenciais nos tratamentos em pré-colheita constitui uma estratégia para o controle do patógeno em pós-colheita.

Crescimento micelial abundante foi observado no tratamento com o óleo essencial de laranja-doce. O colapsamento da extremidade de tubos germinativos foi observado nos tratamentos com os óleos essenciais de capim-limão e tuia-europa.

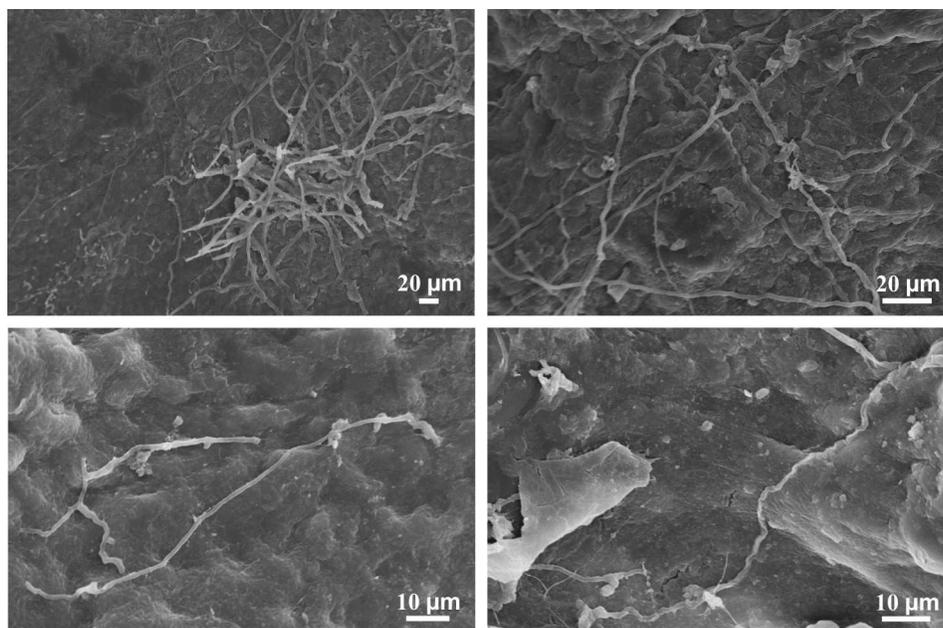


Figura 3 Eletromicrografia de varredura de infecção de *Colletotrichum gloeosporioides* em frutos de goiabeiras (*Psidium guajava* L.) (controle).

Nos pedaços de frutos de goiabeiras inoculados com os conídios em suspensão a 0,1% ($1.000 \mu\text{L}^{-1}$) dos óleos essenciais de tuia-áurea, tuia-europa, limão-siciliano, erva-baleeira, capim-limão, palmarosa, eucalipto (*Eucalyptus globulus*), cravo-da-índia, louro, cidrão, atroveran e orégano, observou-se a emissão de hifas do patógeno apenas a partir das cavidades dos estômatos.

Considerando-se a emissão das hifas apenas a partir das cavidades dos estômatos, pode-se inferir que esses óleos induziram resistência nos frutos, impedindo o patógeno de romper a epiderme, não sendo verificada ruptura na mesma. A resistência induzida é um fenômeno biológico complexo que envolve a ativação de vários processos, incluindo hipersensibilidade, barreiras estruturais, aumento de síntese de fitoalexinas e acúmulo de proteínas relacionadas à patogênese (PR-proteínas) (HAMMERSCHMIDT, 1999). Frutas e vegetais tratados com indutores intensificam uma reação de defesa antes da

invasão dos microrganismos, desencadeando uma resposta de defesa à infecção. A aplicação deliberada de indutores no início da fase pós-colheita retarda o processo de infecção, prolongando a vida dos frutos no armazenamento (FORBES-SMITH, 1999).

A exploração da atividade biológica de compostos secundários presentes no óleo essencial ou extrato bruto em plantas medicinais, o lado da indução de resistência, pode constituir mais uma forma potencial de controle alternativo de doenças de plantas cultivadas (SCHWAN-ESTRADA et al., 2000).

Esses resultados demonstram o acerto na decisão pela utilização de todos os óleos, mesmo com o potencial fungitóxico previamente determinado *in vitro*, tomada pela dúvida sobre os efeitos dos óleos sobre o patógeno e o hospedeiro.

Para se determinar a eficiência de um tratamento, faz-se necessário analisar a interação entre as características do patógeno, da planta e do produto utilizado.

A maior ou a menor inibição de germinação observada no presente trabalho podem ser atribuídas, por exemplo, às características dos óleos essenciais, como volatilidade, solubilidade limitada em água (SIMÕES; SPITZER, 1999) e complexa composição (BAKKALI, 2008). Possivelmente, a maior concentração de alguns desses óleos promoveria uma maior inibição ou, até mesmo, inibição total.

Nas interações planta-patógeno, bem como em situações de estresses abióticos, o etileno comporta-se como um sinalizador (BLEECKER; KENDE, 2000). Geralmente, a taxa de produção de etileno aumenta com a maturação da fruta, danos físicos, incidência de doenças, aumento de temperatura (acima de 30°C) e estresse hídrico (KADER, 2002).

Os cortes para a obtenção dos pedaços de frutos utilizados caracterizam um dano físico que certamente estimulou o aumento de etileno, tornando o

ambiente favorável ao desenvolvimento do patógeno. Talvez, se os frutos tivessem permanecido inteiros, maior eficiência teria sido observada.

Apesar de a infecção de *C. gloeosporioides* ter ocorrido na presença de todos os tratamentos em diferentes intensidades, se comparada à infecção estabelecida no controle, ainda assim, os óleos essenciais podem ser considerados como produtos alternativos potenciais para o controle de antracnose. Entretanto, formas e épocas de aplicação, concentrações e dosagens devem ser estudadas.

3.4 Efeito de compostos voláteis de óleos essenciais e película à base de fécula de mandioca sobre os eventos de pré-penetração e reprodução de *Colletotrichum gloeosporioides* em frutos de goiabeira, por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Na natureza, a difusão de traços de compostos voláteis pode induzir ou inibir a germinação e o crescimento, ou desencadear alterações no desenvolvimento em plantas e fungos (FRENCH, 1992).

A ação fungitóxica dos compostos voláteis dos óleos essenciais de canela, erva-baleeira, cravo-da-índia, atroveran, orégano, erva-doce e tomilho foi comprovada pela inibição total do crescimento micelial de *C. gloeosporioides*, *in vitro*.

In vivo, o tempo de coleta das amostras, determinado em 72 horas após a inoculação, tornou difícil a verificação e ou a determinação dos efeitos dos compostos voláteis dos óleos essenciais testados sobre os eventos de infecção do patógeno em função da ruptura da epiderme dos frutos e a liberação de conídios ter ocorrido.

O resultado mais relevante foi observado na exposição de *Colletotrichum gloeosporioides* ao óleo essencial de *Thymus vulgaris* (tomilho),

que promoveu o colapsamento das hifas (Figura 4).

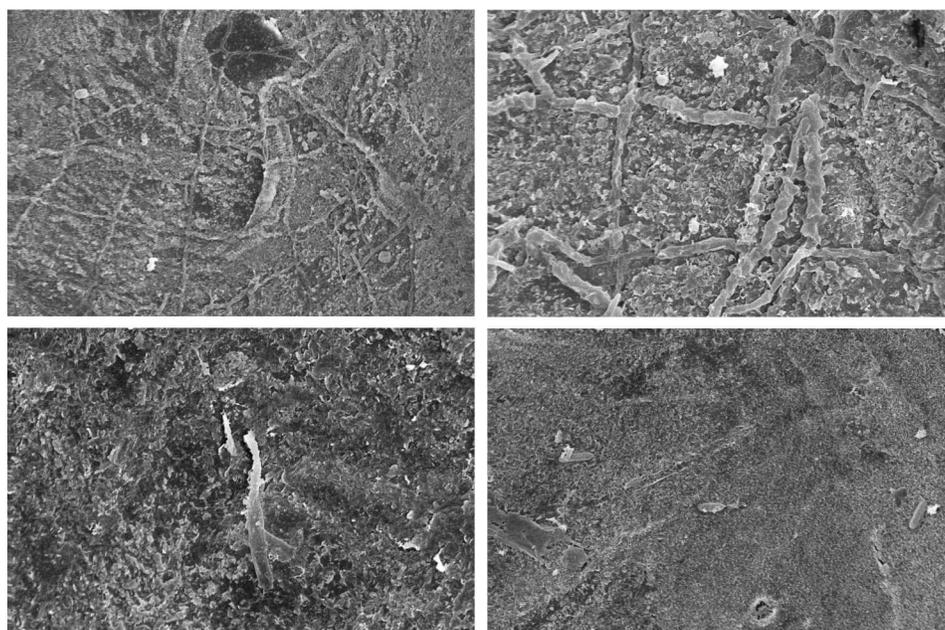


Figura 4 Eletromicrografia de varredura de *Colletotrichum gloeosporioides* exposto a 20 μ L do óleo essencial de *Thymus vulgaris* (tomilho), demonstrando o colapsamento de hifas (A e B) e da extremidade do tubo germinativo (C), e a inibição de germinação (D).

A degeneração de hifas e o extravasamento celular de *Colletotrichum lindemuthianum* e *Pythium ultimum* pelo óleo de tomilho a 800 ppm, que promoveu a redução do crescimento micelial, *in vitro*, foram observados por Zambonelli et al. (1996), por meio da microscopia eletrônica de varredura. Soylu, Soylu e Kurt (2006), por meio de microscopia eletrônica de varredura e microscopia de luz, verificaram alterações morfológicas das hifas de *Phytophthora infestans* expostas às fases voláteis e de contato do óleo de orégano (*Origanum syriacum* var. *bevanii*), como coagulação citoplasmática,

vacuolização, enrugamento das hifas e extravasamento do protoplasto. Sharma e Tripathi (2006), por meio de microscopia eletrônica de varredura, observaram, além da distorção, do afinamento da parede e da redução do diâmetro das hifas, a ausência de conidióforos em *Aspergillus niger*, promovida pelo óleo essencial *Citrus sinensis*.

Entretanto, crescimento micelial normal também foi observado em presença do óleo essencial de tomilho, provavelmente, devido às distâncias entre os pontos de inoculação do patógeno e aplicação do óleo. Esse fato evidencia a necessidade de um sistema com fluxo de ar, permitindo a circulação dos voláteis dentro das embalagens.

3.5 Efeito de óleos essenciais sobre ultraestrutura de conídios de *Colletotrichum gloeosporioides*, por meio de microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Pela análise das imagens obtidas em microscopia eletrônica de transmissão (MET), verificou-se que os óleos essenciais de palmarosa, cravo-da-índia, tomilho, canela e capim-limão a 0,5% causaram danos severos e irreversíveis nos conídios de *C. gloeosporioides*, impossibilitando a germinação.

Nos conídios não tratados do controle, observou-se a integridade da parede celular, da membrana plasmática e das organelas, e a organização do citoplasma (Figura 5A). Alterações na parede celular e na membrana plasmática e vacuolização do citoplasma foram observadas nos conídios do patógeno tratados com os óleos essenciais de palmarosa, cravo-da-índia, tomilho, canela e capim-limão (Figuras 5B, C; D E e F). O escurecimento observado nos conídios tratados com o óleo essencial de cravo-da-índia indica o acúmulo de material eletrodense, ou seja, a presença de ósmio, que proporciona, em contato com os elétrons, a formação de imagem escura, evidenciando que o óleo tornou a

membrana permeável e penetrou, impedindo a germinação (Figura 5C). Os óleos essenciais de canela e capim-limão promoveram o extravasamento do conteúdo citoplasmático de alguns conídios (Figuras 5E e 5F).

As variações nas mudanças ultraestruturais, causadas nos conídios por um óleo, como as observadas para os óleos de canela e capim-limão, causando ou não extravasamento, para Knobloch et al. (1988), podem ocorrer, em função de solubilidade e de interação com a membrana citoplasmática desses compostos, determinando a sua atividade fúngica. Como substâncias lipofílicas, os óleos essenciais podem promover a ruptura da parede celular e da membrana plasmática, afetar a estrutura das diferentes camadas de polissacarídeos, ácidos graxos e fosfolipídios, tornando-as permeáveis (BAKKALI, 2008), permitindo, assim, o extravasamento do conteúdo celular (PIPER et al., 2001). Os trabalhos citados a seguir demonstram as mudanças estruturais celulares observadas em outros patossistemas e ou óleos na tentativa de confirmar os resultados obtidos no presente estudo, considerando-se que o número de pesquisas demonstrando o modo de ação dos óleos essenciais sobre fitopatógenos é reduzido, dificultando a comprovação dos resultados obtidos.

Zambonelli et al. (2004) verificaram que óleo essencial de *Thymus vulgaris* (tomilho) tendo como principal componente o timol causou o aumento da vacuolização do citoplasma e o acúmulo de corpos lipídicos, ondulações no plasmalema e alterações da mitocôndria e retículo endoplasmático de *Colletotrichum lindemuthianum* e *Pythium ultimum*. Rasooli, Rezaei e Allameh (2006) observaram danos irreversíveis às paredes, às membranas e às organelas celulares, pela exposição dos esporos do patógeno aos óleos *Thymus eriocalyx* e *Thymus x-porlock*, nas concentrações inibitórias mínimas de 125 e 250 ppm, respectivamente.

No tratamento pós-colheita de ameixa com vapores do timol visando ao controle da podridão-parda, causada por *Monilinia fructicola*, Svircev et al.

(2007) observaram a cristalização do timol na superfície externa da parede celular fúngica e a ruptura e a desorganização das organelas citoplasmáticas de tubos germinativos, apressórios e hifas. Nenhum efeito dos vapores timol foi observado sobre o citoplasma dos esporos com paredes espessas e estruturas intra e intercelulares das hifas no interior do tecido de ameixa.

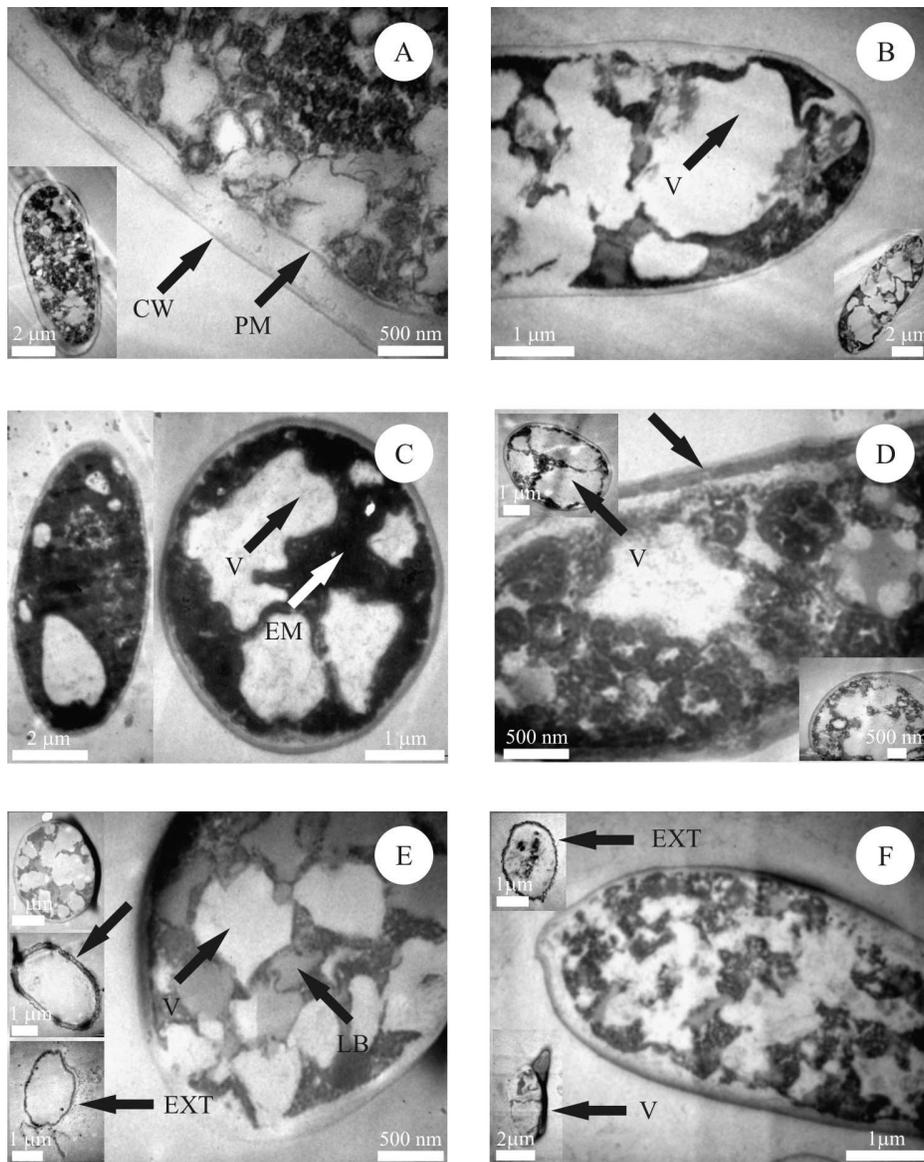


Figura 5 Eletromicrografia de transmissão de conídios de *Colletotrichum gloeosporioides* não tratados (controle) (A); e tratados com os óleos essenciais de *Cymbopogon martinii* (B); *Eugenia caryophyllata* (C); *Thymus vulgaris* (D); *Cinnamomum* sp. (E) e *Cymbopogon citratus* (F) a 0,5%. CW - parede celular; PM - membrana plasmática; V - vacuolização; EM material eletrodense; LB - corpo lipídico e EXT - conteúdo celular extravasado.

Arroyo et al. (2007) verificaram que o composto volátil trans-hex-2-enal causou alterações nas estruturas da parede celular e membrana plasmática, com consequente desorganização e destruição de organelas e, eventualmente, a morte celular de *Colletotrichum acutatum*, um dos agentes causadores de antracnose em morangos. Observações em microscopia eletrônica de transmissão e de luz revelaram alterações morfológicas consideráveis nas hifas e escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*, causadas pelos óleos essenciais de orégano (*Origanum syriacum* var. *bevanii*) e funcho (*Foeniculum vulgare*), que demonstraram eficiência inibindo significativamente o crescimento de *S. sclerotiorum* no solo tratado, aumentando, assim, o número de mudas de tomate sobreviventes para 69,8% e 53,3%, respectivamente (SOYLU et al., 2007).

A aplicação das microscopias eletrônicas de varredura e transmissão na elucidação da interação patógeno-hospedeiro e do modo de ação de óleos essenciais quimicamente complexos sobre os patógenos em nível celular constitui uma ferramenta útil que poderá subsidiar/auxiliar sobremaneira na determinação de estratégias de controle de doenças em plantas.

4 CONCLUSÕES

A película à base de fécula de mandioca estimulou a formação de apressórios, contribuindo para o sucesso do processo de infecção de *C. gloeosporioides*. Entretanto, limitou a colonização dos tecidos dos frutos de goiabeira e a reprodução do patógeno.

A emissão de hifas de *C. gloeosporioides* apenas a partir das cavidades dos estômatos em frutos de goiabeiras (*Psidium guajava* L.) indicou uma possível indução de resistência promovida pelos óleos essenciais de *Chamaecyparis plumosa*, *Chamaecyparis psifera*, *Citrus limon*, *Cordia verbenacea*, *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon martinii*, *Eucalyptus globulus*, *Eugenia caryophyllata*, *Laurus nobilis*, *Lippia citriodora*, *Ocimum selloi* e *Origanum vulgare*.

O óleo essencial de tomilho promoveu alteração estrutural nas hifas de *C. gloeosporioides*, podendo vir a ser utilizado como um biofumigante natural no controle de antracnose em pós-colheita.

Os óleos essenciais de palmarosa, cravo-da-índia, tomilho, canela e capim-limão atuam diretamente sobre a estrutura celular dos conídios de *C. gloeosporioides*, promovendo a desorganização e a degradação celular, inviabilizando a germinação.

REFERÊNCIAS

- ALVES, E.; LEITE, B.; KITAJIMA, E. W. Ultraestrutura na era do DNA. In: ISHIDA, A. K. N. et al. **Interação planta-patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular**. Piracicaba: FEALQ, 2008. v. 13, p. 433-466.
- AMORIM, L. Infecção. In: AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, HIROSHI, H. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. cap. 15, p. 295-308. 919 p.
- ARROYO, F. T. et al. Antifungal activity of strawberry fruit volatile compounds against *Colletotrichum acutatum*. **Journal of Agricultural Food and Chemistry**, Easton, v. 55, n. 14, p. 5701-5707, July 2007.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils: a review. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 2, p. 446-475, Feb. 2008.
- BECKETT, A.; HEATH, I. B.; MCLAUGHLIN, D. J. **An atlas of fungal ultrastructure**, London: Longman, 1974. 221 p.
- BINYAMINI, N.; SCHIFFMANN-NADEL, M. Latent infection in Avocado fruit due to *Colletotrichum gloeosporioides*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 62, p. 592-594, 1972.
- BLEECKER, A. B.; KENDE, H. Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, Palo Alto, v. 16, p. 1-18, Nov. 2000.
- BROWN, G. E. Factors affecting postharvest development of *Colletotrichum gloeosporioides* in citrus fruits. **Phytopathology**, Saint Paul, v.65, p.404-409, 1975.
- BUCKLEY, P. M.; SJAHOLM, V. E.; SOMMER, N. F. Electron Microscopy of *Botrytis cinerea* conidia. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 91, n. 5, p. 2037-2044, May 1966.
- CHANG, H. C.; ROUTREE, R. L.; LEU, L. S. Electron microscopic observation of unripe banana fruit infected with *Colletotrichum musae*. **Plant Protection Bulletin**, Taiwan, v. 42, n. 3, p. 135-146, Sept. 2000.

CHANG, C. W.; LIN, S. H.; LEU, L. S. Electron microscopy of penetration and colonization process of *Colletotrichum musae* on ripe banana fruit. **Plant Protection Bulletin**, Taiwan, v. 29, n. 1, p. 71-75, Mar. 1987.

CHAU, K.F.; ALVAREZ, A. M. A histological study of antracnose on *Carica papaya*. **Phytopathology**, Saint Paul, v.73, p.1113-1116, 1983.

DAMASCENO, S. et al. Efeito da aplicação de película de fécula de mandioca na conservação pós-colheita de tomate. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 3, p. 377-380, set./dez. 2003.

DAQUIOAG, V. R.; QUIMIO, T. H. Latent infection in mango caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. Philipp. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 15, p. 35-46, 1978.

FERREIRA, J. B. et al. Aspectos morfológicos da colonização de *Colletotrichum gloeosporioides* em órgãos de plantas de cafeeiros e com sintomas da mancha manteigosa. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 4, p. 956-964, jul./ago. 2009.

FORBES-SMITH, M. Induced resistance for the biological control of postharvest diseases of fruit and vegetables. **Food Australia**, North Sidney, v.51, n.8, p.382-385, 1999.

FRENCH, R. C. Volatile chemical germination stimulators of rust and other fungal spores. **Mycologia**, New York, v. 84, n. 3, p. 277-288, June 1992.

GORGATTI NETTO, A. et al. **Goiaba para exportação: procedimentos de colheita e pós-colheita**. Brasília: EMBRAPA-SPI/FRUPEX, 1996. 35p. (FRUPEX, Publicações Técnicas, 20).

HAMMERSCHMIDT, R. Induced disease resistance: how do induced plants stop pathogens? **Physiology and Molecular Plant Pathology**, London, v. 55, n. 2, p.77-84, Aug. 1999.

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

JANSSEN, A. M. Antimicrobial activities of essential oils: a pharmacognostical study. In: SIANI, A. C. et al. Óleos essenciais: potencial anti-inflamatório. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 3, n. 16, p. 38-43, set./out. 2000.

KADER, A.A. **Postharvest biology and technology**: an overview. California: USA, 2002. 535 p.

KIM Y. K.; LI, D.; KOLATTUKUDY, P. E. Induction of Ca²⁺-calmodulin signaling by hard-surface contact primes *Colletotrichum gloeosporioides* conidia to germinate and form appressoria. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 180, n. 19, p. 5144-5150, Oct. 1998.

KNOBLOCH, K. et al. Mode of action of essential oil components on whole cells and fungi in plate tests. In: SCHREIER, P. (Ed.). **Bioflavour'87**. Berlin: Walter de Gruyther, 1988. p. 287-299.

KULAKIOTU, E. K.; THANASSOULOPOULOS, C. C.; SFAKIOTAKIS, E. M. Postharvest biological control of *Botrytis cinerea* on kiwifruit by volatiles of 'Isabella' grapes. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 94, n. 12, p. 1280-1285, Dec. 2004.

LEISTNER, L.; GORRIS, G. M. Food preservation by hurdle technology. **Trends in food science and technology**, Cambridge, v. 6, n. 2, p. 41-46, Feb. 1995.

LIM, T. K. ; B. Q. MANICOM. Diseases of guava. In: PLOETZ, R. C. (Ed.). **Diseases of tropical fruit crops**. Homestead: CABI, 2003. chap. 12, p. 275-298.

LITTLEFIELD, L. J.; HEALTH, M. C. **Ultrastructure of rust fungi**. Toronto: Academic, 1979. 275p.

LIU, Z. M.; KOLATTUKUDY, P. E. Identification of a gene product induced by hard-surface contact of *Colletotrichum gloeosporioides* conidia as a ubiquitin-conjugating enzyme by yeast complementation. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 180, n. 14, p. 3592-3597, July 1998.

LOPEZ, A. M. Q. **Taxonomia, patogênese e controle de espécies do gênero *Colletotrichum***. Passo Fundo: Ed. Padre Berthier dos Missionários da Sagrada Família, 2001. (Revisão Anual de Patologia de Plantas, 9).

MACIEL, M. I. S. et al. Effects of biofilm and refrigeration on acerola postharvest conservation. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 26, n. 1, p. 168-170, abr. 2004.

MAEDA, K.M. **An ultrastructural study of *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. Infection of *Malus* hosts.** 1970. 112 p. Thesis (Master's) - Purdue University, Purdue.

MARI, M.; BERTOLINI, P.; PRATELLA, G.C. Non-conventional methods for the control of post-harvest pear diseases. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 94, n. 5, p. 761-766, 2003.

OLIVEIRA, M. A.; CEREDA, M. P. Efeito da película de mandioca na conservação de goiabas. **Revista Brasileira de Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 2, n. 1/2, p. 97-102, jan./jun. 1999.

OSHEROV, N.; MAY, G. S. The molecular mechanisms of conidial germination. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 199, n. 2, p. 153-160, Apr. 2001.

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, nov./dez. 2006.

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, Mar. 2002.

PERFECT, S. E. et al. *Colletotrichum*: a model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 27, n. 2/3, p. 186-198, July 1999.

PIPER, P. et al. Weak acid adaptation: the stress response that confers yeasts with resistance to organic acid food preservatives. **Microbiology**, Reading, v. 147, pt. 10, p. 2635-2642, Oct. 2001.

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**, Guildford, v. 17, n. 5, p. 359-364, May 2006.

REIS, K. C. dos. et al. Pepino japonês (*Cucumis sativus* L.) submetido ao tratamento com fécula de mandioca. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 3, p. 487-493, maio/jun. 2006.

RÓZ, A. L. da. et al. Comportamento térmico e de absorção de umidade de amidos plastificados com glicóis. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE POLÍMEROS, 6., 2001, Gramado. **Anais...** Gramado: [s.n.], 2001. CD-ROM.

RUAN, Y.; KOTRAIAH, V.; STRANEY, D. C. Flavonoids stimulate spore germination in *Fusarium solani* pathogenic on legumes in a manner sensitive to inhibitors of cAMP-dependent protein kinase. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 8, p. 929-938, Aug. 1995.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. da S. Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos. **Floresta**, Curitiba, v.30, n. 1/2, p.129-137, jun./dez. 2000.

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, June 2006.

SIMMONDS, J. H. Latent infection in tropical fruits discussed in relation to the part played by species of *Gloeosporium* and *Colletotrichum*. **Proceedings of the Royal Society of Queensland**, Queensland, v. 52, p. 92-120, 1941.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. DE O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2. ed. Porto Alegre: UFRGS, 2000. cap. 18, p. 467-495.

SOYLU, E. M.; SOYLU, S.; KURT, S. Antimicrobial activities of the essential oils of various plants against tomato late blight disease agent *Phytophthora infestans*. **Mycopathologia**, Dee Haag, v. 161, n. 2, p. 119-128, Feb. 2006.

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, Oct. 2007.

SVIRCEV, A. M. et al. Effects of timol fumigation on survival and ultrastructure of *Monilinia fructicola*. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 45, n. 2, p. 228-233, 2007.

TERAO, D.; SILVA, E. de O. 2006. Controle alternativo com bloqueador de etileno. In: OLIVEIRA, S. M. A.; TERAQ, D.; DANTAS, S. A. F.; TAVARES, S. C. C. H. (Ed.). **Patologia pós-colheita: frutas, olerícolas e ornamentais tropicais**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2006, cap. 10, p. 265-287.

ZADOKS, J. C. The costs of change in plant protection. **Journal of Plant Protection in the Tropics**, Kuala Lumpur, v. 9, p. 151-159, 1992.

ZAMBONELLI, A. et al. Effects of essential oils on phytopathogenic fungi in vitro. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 144, n. 2, p. 491-494, Feb. 1996.

ZAMBONELLI, A. et al. Chemical composition and fungicidal activity of commercial essential oils of *Thymus vulgaris* L. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 16, n. 1, p. 69-74, Jan./Feb. 2004.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante das exigências impostas pelo mercado e consumidores relativas à produção de alimentos de qualidade e saudáveis, produzidos em conformidade com os requisitos de sustentabilidade ambiental, segurança alimentar e viabilidade econômica, o controle alternativo de doenças que se tornou imprescindível.

No controle alternativo de *Colletotrichum gloeosporioides* e da antracnose em frutos de goiabeira, no presente trabalho, os óleos essenciais e a película à base de fécula de mandioca demonstraram potencial, constituindo uma estratégia inovadora e útil para proteção em pós-colheita.

Na interação patógeno-hospedeiro, por meio de microscopia eletrônica de varredura, foi possível observar que os apressórios apresentaram-se como estruturas essenciais para a pré-penetração dos frutos e sucesso do processo de infecção caracterizada como latente. Os óleos essenciais testados não apresentaram efeito sobre essas infecções latentes, entretanto, por meio de microscopia eletrônica de transmissão, verificou-se que os óleos de palmarosa, cravo-da-índia, tomilho, canela e capim-limão causaram danos severos e irreversíveis nos conídios do patógeno, impossibilitando a germinação, *in vitro*.

Com esses resultados, pode-se inferir que a aplicação dos óleos essenciais em pré-colheita poderá constituir uma estratégia eficiente para o controle do patógeno em pós-colheita. Assim, pesquisas devem ser desenvolvidas, envolvendo o monitoramento de infecção latente, a fim de se conhecer a época de infecção no ciclo da cultura para a determinação das aplicações dos tratamentos.

A inibição do crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum musae* expostos aos compostos voláteis dos óleos essenciais

verificada, *in vitro*, bem como a mudança estrutural das hifas de *C. gloeosporioides* na presença do óleo de tomilho, *in vivo*, indicam a possível utilização desses como biofumigantes naturais a serem testados em embalagens e câmaras, alterando a composição da atmosfera local e promovendo a inibição dos patógenos em pós-colheita.

Pesquisas referentes a concentrações devem ser desenvolvidas para determinar *in vivo* o potencial dos óleos essenciais sobre a germinação e a formação de apressórios de *Colletotrichum gloeosporioides*, e *Colletotrichum musae* observado *in vitro*.

O efeito dos óleos essenciais e seus compostos sobre a ativação ou indução de respostas de defesa nos frutos também demanda mais pesquisas. A determinação da composição dos óleos e da atividade biológica, além de conferir maior confiabilidade aos resultados, poderá contribuir para a síntese de novos produtos, pela indústria química.

A eficiência da película à base de fécula de mandioca no controle do patógeno com o aumento da vida de prateleira verificada nos frutos de goiabeira incita o desenvolvimento de pesquisas para a conservação em pós-colheita de outros produtos.

Os resultados obtidos no presente trabalho evidenciam a demanda de pesquisas para que o controle alternativo de doenças em pós-colheita se torne uma realidade em toda a cadeia produtiva, com a mesma credibilidade que durante anos foi conferida apenas ao controle químico.