

**EFEITO *IN VITRO* E *IN VIVO* DOS ÓLEOS
ESSENCIAIS DE CONDIMENTOS SOBRE
FUNGOS QUE OCORREM EM PÓS-COLHEITA
EM FRUTOS DE MORANGO E MAMÃO**

FERNANDA CHAVES DA SILVA

2008

FERNANDA CHAVES DA SILVA

**EFEITO *IN VITRO* E *IN VIVO* DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE
CONDIMENTOS SOBRE FUNGOS QUE OCORREM EM PÓS-
COLHEITA EM FRUTOS DE MORANGO E MAMÃO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de
Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Microbiologia Agrícola, para a
obtenção do título de “Mestre”

Orientadora

Pesquisadora Dr^a. Sara Maria Chalfoun

**LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2008**

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

Silva, Fernanda Chaves da.

Efeito *in vitro* e *in vivo* dos óleos essenciais de condimentos sobre
fungos que ocorrem em pós-colheita em frutos de morango e mamão /
Fernanda Chaves da Silva. – Lavras : UFLA, 2008.

85 p. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2008.

Orientador: Sara Maria Chalfoun.

Bibliografia.

1. Atividade antimicrobiana. 2. Fungos filamentosos. 3. Conservantes
naturais. 4. Segurança alimentar. I. Universidade Federal de Lavras. II.
Título.

CDD – 576.163
- 589.2

FERNANDA CHAVES DA SILVA

**EFEITO *IN VITRO* E *IN VIVO* DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE
CONDIMENTOS SOBRE FUNGOS QUE OCORREM EM PÓS-
COLHEITA EM FRUTOS DE MORANGO E MAMÃO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de
Lavras como parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para a
obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 03 de março de 2008.

Pesquisador Dr. Hécio Costa

INCAPER

Prof. Dr. Luís Roberto Batista

UFLA

Pesquisador Dr. Rodrigo Luz da Cunha

EPAMIG

Dra. Sara Maria Chalfoun
EPAMIG
(Orientadora)

**LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL**

A Deus, pela presença constante em minha vida.

À minha mãe Tânia e ao meu pai Wilson, por serem meus exemplos de educação e vida.

Aos meus irmãos, Bruno e Daniel, pelo apoio, incentivo e compreensão.

As minhas avós, Maria das Dores e Nair (*in memória*), pelo carinho e amor incondicional.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho, em especial:

À pesquisadora Dr^a. Sara Maria Chalfoun, pela oportunidade, orientação, dedicação e amizade.

Ao pesquisador Hércio Costa, pelo apoio e incentivo incondicionais.

Ao professor Dr. Luís Roberto Batista, pelo apoio na identificação dos fungos.

Ao pesquisador Rodrigo Luz da Cunha, pela colaboração.

À Dr^a Deila Magna dos Santos Botelho, pelo apoio nas análises estatísticas, boa vontade e amizade.

À colega Glêndara, pelo apoio na elaboração dos Abstracts.

Ao colega Marcelo, pelos conselhos e sugestões.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, pela cooperação e ensinamentos.

À EPAMIG, por permitir a realização do experimento *in vitro*.

Ao INCAPER, por permitir a realização do experimento *in vivo*.

Aos funcionários e técnicos dos Laboratórios de Microbiologia Agrícola, EPAMIG e INCAPER, pessoas de quem recebi importante apoio.

Aos colegas de Laboratório e mestrado, pela ajuda e amizade.

Aos colegas de classe, Cíntia, Danila, Karina, Rogério, Sandra e Vívian, pelos bons momentos.

À amiga Cláudia e familiares pelo acolhimento e carinho em minha chegada a Lavras.

Às AMIGAS de república, Adriene, Cíntia, Cynthia e Vívian, pela amizade, consideração, compreensão e apoio incondicional durante toda essa caminhada.

Aos amigos distantes, mas que de alguma forma estão sempre presentes em minha vida.

Ao Tiago, pelo apoio, paciência e carinho, fundamentais para a realização dessa conquista.

Aos demais familiares, pelos conselhos, apoio e amor.

À grande incentivadora e tutora do PET/ECD, professora Aurora Ribeiro de Goicochea, da Universidade Federal de Viçosa/MG.

À Ana Íris Mendes Coelho, Regina Célia Rodrigues Miranda Milagres, Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto e Paulo Fernando da Glória Leal, pelo incentivo e ensinamentos na área de Microbiologia.

À CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado.

À FAPEMIG, pelo apoio financeiro ao projeto.

SUMÁRIO

	Páginas
LISTA DE TABELAS	i
LISTA DE FIGURAS	ii
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
INTRODUÇÃO	1
REFERENCIAL TEÓRICO	3
CAPÍTULO 1 Efeito <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> dos óleos essenciais de condimentos sobre o desenvolvimento micelial e esporulação de fungos em frutos de morango (<i>Fragaria spp.</i>)	13
RESUMO	15
ABSTRACT	16
1 INTRODUÇÃO	17
2 MATERIAL E MÉTODOS	19
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
3.1 Efeito dos óleos essenciais de alecrim, alho, canela, erva-doce, manjerição, menta, orégano e tomilho sobre o desenvolvimento do fungo <i>Rhizopus stolonifer</i> sob condições <i>in vitro</i>	23
3.2 Ensaio do óleo essencial de cravo-da-índia sobre o desenvolvimento do fungo <i>Rhizopus stolonifer</i> sob condições <i>in vitro</i>	31
3.3 Efeito inibitório de óleos essenciais de condimentos no controle de fungos na fase pós-colheita de frutos de morango	36
4 CONCLUSÕES	40
5 AGRADECIMENTOS	41
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

CAPÍTULO 2 Efeito <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> dos óleos essenciais de condimentos sobre o desenvolvimento de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> em frutos de mamão (<i>Carica papaya L.</i>).....	48
RESUMO	50
ABSTRACT	51
1 INTRODUÇÃO	52
2 MATERIAL E MÉTODOS	55
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
3.1 Efeito inibitório de óleos essenciais de alecrim, alho, canela, erva-doce, manjerição, menta, orégano e tomilho sobre o desenvolvimento micelial e esporulação do fungo <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> sob condições <i>in vitro</i> ..	59
3.2 Ensaio do óleo essencial de cravo-da-índia sobre o desenvolvimento do fungo <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> sob condições <i>in vitro</i>	69
3.3 Efeito inibitório de óleos essenciais de condimentos no controle de fungos na fase pós-colheita de frutos de mamão	74
4 CONCLUSÕES	76
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
6 AGRADECIMENTOS	85

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1 Efeito inibitório *in vitro* e *in vivo* dos óleos essenciais de condimentos sobre o desenvolvimento micelial e esporulação de fungos em frutos de morango (*Fragaria spp.*)

TABELA 1 Valores médios de notas do Desenvolvimento micelial do fungo *Rhizopus stolonifer* isolado do morango, submetidos a diferentes óleos essenciais de condimentos em dois métodos de adição do óleo (adicionado sobre o meio de cultura e sob a tampa da placa de Petri)..... 24

TABELA 2 Valores médios do número de esporos (cel/cm³) do fungo *Rhizopus stolonifer*, isolado de morango, submetidos a diferentes óleos essenciais de condimentos, concentrações e dois métodos de adição do óleo (adicionado sobre o meio de cultura e sob a tampa da placa de Petri)..... 26

CAPÍTULO 2 Efeito *in vitro* e *in vivo* de óleos essenciais de condimentos sobre o desenvolvimento de *Colletotrichum gloesporioides* em frutos de mamão (*Carica papaya L.*)

TABELA 1 Valores médios de notas do Desenvolvimento micelial do fungo *Rhizopus stolonifer*, isolado de morango, submetidos a diferentes óleos essenciais de condimentos, concentrações e dois métodos de adição do óleo (adicionado sobre o meio de cultura e sob a tampa da placa de Petri)..... 61

TABELA 2 Valores médios do número de esporos (cel/cm³) do fungo *Rhizopus stolonifer*, isolado de morango, submetidos a diferentes óleos essenciais de condimentos, concentrações e dois métodos de adição do óleo (adicionado sobre o meio de cultura e sob a tampa da placa de Petri)..... 64

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1 Efeito inibitório *in vitro* e *in vivo* dos óleos essenciais de condimentos sobre o desenvolvimento micelial e esporulação de fungos em frutos de morango (*Fragaria* spp).

FIGURA 1 Efeito das concentrações do óleo essencial de tomilho quando adicionado sobre o meio de cultura com o fungo no desenvolvimento micelial esporulação do fungo *Rhizopus stolonifer*. Lavras, MG, 2008 28

FIGURA 2 Efeito das concentrações dos óleos essenciais de alho, canela, tomilho, menta e erva-doce quando adicionados sobre o meio de cultura com o fungo na esporulação do fungo *Rhizopus stolonifer*. Lavras, MG, 2008 29

FIGURA 3 Efeito das concentrações dos óleos essenciais de alho, canela, erva-doce, menta e orégano quando adicionados sob a tampa da placa de Petri com o fungo na esporulação do fungo *Rhizopus stolonifer*. Lavras, MG, 2008..... 31

FIGURA 4 Contraste das médias de controle do fungo *Rhizopus stolonifer* expresso em média geral do desenvolvimento micelial quando submetido ao tratamento com óleo essencial de cravo-da-índia adicionado sobre o meio de cultura com o fungo. Lavras, MG, 2008..... 33

FIGURA 5 Contraste das médias de controle do fungo *Rhizopus stolonifer* expresso em média geral de esporos quando submetido ao tratamento com óleo essencial de cravo-da-índia adicionado sobre o meio de cultura com o fungo. Lavras, MG, 2008..... 34

FIGURA 6 Contraste das médias de controle do fungo *Rhizopus stolonifer* expresso em média geral do desenvolvimento micelial quando submetido ao tratamento com óleo essencial de cravo-da-índia adicionado sob a tampa da placa de Petri. Lavras, MG, 2008..... 35

FIGURA 7	Contraste das médias de controle do fungo <i>Rhizopus stolonifer</i> expresso em média geral de esporos quando submetido ao tratamento com óleo essencial de cravo-da-índia adicionado sob a tampa da placa de Petri. Lavras, MG, 2008	36
FIGURA 8	Efeito do período de conservação pós-colheita sobre a incidência de fungos em frutos de morango, obtidos do cultivo orgânico. Domingos Martins, 2008.....	37
FIGURA 9	Evolução diária da incidência de fungos em frutos de morangos submetidos a tratamentos com óleos essenciais de condimentos. Domingos Martins, ES, 2008.....	39

CAPÍTULO 2 Efeito *in vitro* e *in vivo* de óleos essenciais de condimentos sobre o desenvolvimento de *Colletotrichum gloesporioides* em frutos de mamão (*Carica papaya* L.)

.FIGURA 1	Efeito das concentrações dos óleos essenciais de canela e erva-doce quando adicionados sobre o meio de cultura com o fungo no desenvolvimento micelial esporulação do fungo <i>Colletotrichum gloesporioides</i> . Lavras, MG, 2008.....	66
FIGURA 2	Efeito das concentrações dos óleos essenciais de canela, erva-doce, menta, orégano e alho quando adicionados sobre o meio de cultura com o fungo na esporulação do fungo <i>Colletotrichum gloesporioides</i> . Lavras, MG, 2008.....	67
FIGURA 3	Efeito das concentrações dos óleos essenciais de alho, canela, manjerição e menta quando adicionados sob a tampa da placa de Petri com o fungo no desenvolvimento micelial do fungo <i>Colletotrichum gloesporioides</i> . Lavras, MG, 2008.....	68
FIGURA 4	Efeito das concentrações dos óleos essenciais de erva-doce e manjerição quando adicionados sob a tampa da placa de Petri com o fungo na esporulação do fungo <i>Colletotrichum gloesporioides</i> . Lavras, MG, 2008.....	69
FIGURA 5	Contraste das médias de controle do fungo <i>Colletotrichum gloesporioides</i> expresso em média geral do desenvolvimento micelial quando submetido ao tratamento com óleo essencial de cravo-da-índia adicionado sobre o meio de cultura com o fungo. Lavras, MG, 2008.....	70
FIGURA 6	Contraste das médias de controle do fungo <i>Colletotrichum gloesporioides</i> expresso em média geral de esporos quando submetido ao tratamento com óleo essencial de cravo-da-índia adicionado sobre o meio de cultura com o fungo. Lavras, MG, 2008.....	71

FIGURA 7	Contraste das médias de controle do fungo <i>Colletotrichum gloesporioides</i> expresso em média geral do desenvolvimento micelial quando submetido ao tratamento com óleo essencial de cravo-da-índia adicionado sob a tampa da placa de Petri. Lavras, MG, 2008	72
FIGURA 8	Contraste das médias de controle do fungo <i>Colletotrichum gloesporioides</i> expresso em média geral de esporos quando submetido ao tratamento com óleo essencial de cravo-da-índia adicionado sob a tampa da placa de Petri. Lavras, MG, 2008.....	73
FIGURA 9	Severidade do fungo <i>Colletotrichum gloesporioides</i> em mamão sob o efeito dos óleos essenciais de tomilho, menta, alecrim, alho, canela e manjerição. Domingos Martins, 2008.	75
CAPÍTULO 3	Efeito <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de óleos essenciais de condimentos sobre o desenvolvimento de <i>Colletotrichum gloesporioides</i> em frutos de mamão (<i>Carica papaya</i> L.)	
.FIGURA 1	Efeito das concentrações dos óleos essenciais de canela e erva-doce quando adicionados sobre o meio de cultura com o fungo no desenvolvimento micelial esporulação do fungo <i>Colletotrichum gloesporioides</i> . Lavras, MG, 2008.....	74
FIGURA 2	Efeito das concentrações dos óleos essenciais de canela, erva-doce, menta, orégano e alho quando adicionados sobre o meio de cultura com o fungo na esporulação do fungo <i>Colletotrichum gloesporioides</i> . Lavras, MG, 2008.....	75
FIGURA 3	Efeito das concentrações dos óleos essenciais de alho, canela, manjerição e menta quando adicionados sob a tampa da placa de Petri com o fungo no desenvolvimento micelial do fungo <i>Colletotrichum gloesporioides</i> . Lavras, MG, 2008.....	76
FIGURA 4	Efeito das concentrações dos óleos essenciais de erva-doce e manjerição quando adicionados sob a tampa da placa de Petri com o fungo na esporulação do fungo <i>Colletotrichum gloesporioides</i> . Lavras, MG, 2008.....	77

FIGURA 5	Contraste das médias de controle do fungo <i>Colletotrichum gloesporioides</i> expresso em média geral do desenvolvimento micelial quando submetido ao tratamento com óleo essencial de cravo-da-índia adicionado sobre o meio de cultura com o fungo. Lavras, MG, 2008	78
FIGURA 6	Contraste das médias de controle do fungo <i>Colletotrichum gloesporioides</i> expresso em média geral de esporos quando submetido ao tratamento com óleo essencial de cravo-da-índia adicionado sobre o meio de cultura com o fungo. Lavras, MG, 2008.....	79
FIGURA 7	Contraste das médias de controle do fungo <i>Colletotrichum gloesporioides</i> expresso em média geral do desenvolvimento micelial quando submetido ao tratamento com óleo essencial de cravo-da-índia adicionado sob a tampa da placa de Petri. Lavras, MG, 2008	80
FIGURA 8	Contraste das médias de controle do fungo <i>Colletotrichum gloesporioides</i> expresso em média geral de esporos quando submetido ao tratamento com óleo essencial de cravo-da-índia adicionado sob a tampa da placa de Petri. Lavras, MG, 2008.....	81
FIGURA 9	Severidade do fungo <i>Colletotrichum gloesporioides</i> em mamão sob o efeito dos óleos essenciais de tomilho, menta, alecrim, alho, canela e manjerição. Domingos Martins, 2008.	83

RESUMO

Silva, Fernanda Chaves da. **Efeito “*in vitro*” e “*in vivo*” dos óleos essenciais de condimentos sobre fungos que ocorrem em pós-colheita em frutos de morango e mamão.** Lavras: UFLA, 2008, 85p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola)*

O presente estudo testou a atividade antifúngica dos óleos essenciais dos condimentos alecrim (*Lantana microphylla*), alho (*Allium sativum*), canela (*Cinnamomum spp.*), cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticus*), erva-doce (*Pimpinella anisum*), manjerição (*Ocimum basillium*), menta (*Mentha piperita*), orégano (*Origanum vulgare*) e tomilho (*Thymus vulgaris*) sobre o desenvolvimento micelial e esporulação de fungos que ocorrem em frutos de morango e sobre o desenvolvimento do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* incidente sobre frutos de mamão. Os óleos essenciais de condimentos foram testados *in vitro* nas concentrações 500, 1000, 1500 e 2000 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Para o óleo essencial de cravo-da-índia as concentrações testadas foram 200, 400, 600, 800 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Como culturas testes utilizaram-se o *Rhizopus stolonifer* e *Colletotrichum gloeosporioides* para frutos de morango e mamão, respectivamente. Nos testes *in vivo*, os óleos essenciais foram selecionados conforme sua eficiência *in vitro*, além do uso de fungicida químico e álcool etílico puro. A eficácia do tratamento hidrotérmico de frutos de mamão também foi avaliada. Observou-se que os óleos essenciais apresentaram efeito inibitório significativo sobre o desenvolvimento micelial e esporulação *in vitro* e *in vivo* dos fungos, destacando-se os óleos essenciais de erva-doce, orégano e tomilho nas concentrações, 1500, 2000 e 2000 $\mu\text{g ml}^{-1}$, respectivamente, para fungos incidentes em frutos de morango e o óleo essencial de menta na concentração de 1500 $\mu\text{g ml}^{-1}$ sobre o fungo *Colletotrichum gloeosporioides*. De um modo geral, os óleos apresentaram maior eficácia sobre o desenvolvimento dos fungos estudados quando adicionados sob a tampa das placas de Petri. Verifica-se, portanto, que os óleos essenciais de condimentos exercem ação antifúngica e podem ser aplicados no controle desses patógenos.

* Comitê de Orientação: Orientadora: Pesquisadora Sara Maria Chalfoun
Co-orientador: Pesquisador Hércio Costa

ABSTRACT

SILVA, Fernanda Chaves da. **Effect *in vitro* and *in vivo* of spices essential oils over the fungi that occur in posharvest fruit in the strawberry and papaya.** 2008. 85p. Dissertation (Master's degree in Agricultural Microbiology) - Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.

The present study it was tested the antifungal activity of the spices's essential oils, rosemary (*Lantana microphylla*), garlic (*allium sativum*), cinnamon (*Cinnamomun spp.*), clove (*Caryophyllus aromaticus*), anise (*Pimpinella anisum*), basil (*Ocimum basillium*), mint (*Mentha piperita*), oregano (*Origanum vulgare*) and thyme (*Thymus vulgaris*) over the fungi mycelial development and sporulation that occurs in strawberries fruits and over of the fungal *Colletotrichum gloeosporioides* present over papaya. The spices's essential oils were tested in vitro in the 0, 500, 1000, 1500 and 2000 µg ml⁻¹ concentrations. To the clove the concentration tested was 0, 200, 400, 600 and 800 µg ml⁻¹. The test cultures were *Rhizopus stolonifer* and *Colletotrichum gloeosporioides* to the strawberries and papaya fruits, respectively. In the *in vivo* tests, the essential oils were selected according to its in vitro efficiency, besides the chemical fungicide and absolute ethyl alcohol use. The efficacy of hydrothermic treatment of papaya fruits was evaluated too. It was observed that the essential oils presented a significant inhibitory effect over the fungi mycelia development and sporulation *in vitro* and *in vivo*, highlighting the anise, oregano and tyme essential oil in the concentrations 1500, 2000, 2000 µg ml⁻¹, respectively, to the fungi incidents in strawberries fruits and the mint essential oil in the concentrations of 1500 over the fungi *Colletotrichum gloeosporioides*. In general the oils presented greater effectiveness over the development of the fungi studied when added under the Petri plate's lid. It was verified, therefore, that spices's essential oils exercise antifungal action and can be applied in the pathogens control.

* Comitê de Orientação: Orientadora: Pesquisadora Sara Maria Chalfoun
Co-orientador: Pesquisador Hércio Costa

INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de frutas, com uma produção que supera os 35 milhões de toneladas. As culturas do mamão e do morango destacam-se nesse cenário, mas doenças que incidem nas fases de pré e pós-colheita afetam negativamente os cultivos em aspectos relativos à qualidade e quantidade das frutas.

As perdas pós-colheita são caracterizadas principalmente pela ação de patógenos, sendo a redução dessas um desafio para a fruticultura visto que, as frutas apresentam características que favorecem o ataque desses organismos.

Dentre os principais patógenos destacam-se os fungos, como consequência do amplo número de espécies envolvidas e da diversidade e eficiência dos mecanismos de penetração nos frutos.

Apesar de o morango ser um fruto com gosto e aroma agradável, textura succulenta, sendo por isso muito apreciado e valorizado, apresenta também alta perecibilidade e susceptibilidade à patógenos causadores de doenças, por exemplo, o fungo *Rhizopus stolonifer*.

O mamão é considerado um fruto de vida pós-colheita curta, susceptível ao ataque de patógenos, dentre esses, o fungo *Colletotrichum gloesporioides*, causador da antracnose, doença de elevada importância econômica no Brasil.

O uso de fungicidas é o método mais utilizado na prevenção dessas doenças. Contudo, relatos afirmam o caráter teratogênico e carcinogênico desses produtos além, do uso indiscriminado destes que proporciona a seleção de microrganismos resistentes. Soma-se a este fato, a demanda pelos consumidores, por produtos isentos de resíduos que possam vir a prejudicar à sua saúde.

A exploração da atividade biológica de compostos secundários presentes no extrato bruto e óleos essenciais de plantas condimentares pode-se constituir em uma forma potencial de controle alternativo de doenças de plantas.

Dessa forma, conduziu-se este estudo, com o objetivo de verificar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais obtidos dos condimentos alecrim (*Lantana microphylla*), alho (*Allium sativum*), canela (*Cinnamomum spp.*), erva-doce (*Pimpinella anisum*), manjerição (*Ocimum basillium*), menta (*Mentha piperita*), orégano (*Origanum vulgare*) e tomilho (*Thymus vulgaris*), *in vitro* e *in vivo*, sobre o desenvolvimento micelial e esporulação de fungos que ocorrem em frutos de morango e sobre o desenvolvimento do fungo *Colletotrichum gloesporioides* incidente sobre frutos de mamão.

REFERENCIAL TEÓRICO

O Brasil é um dos três maiores produtores mundiais de frutas. Sua produção supera os 35 milhões de toneladas, superado apenas pela China e Índia (IBRAF, 2006). A fruticultura representa importância sócio-econômica de grande valor, pois além de fundamentada em pequenas e médias propriedades, emprega 5,6 milhões de pessoas, totalizando 27% da mão-de-obra agrícola. (Fernandes, 2006). Neste cenário, destacam-se as culturas de morango e mamão.

A produção de frutos de morango corresponde a 100 toneladas por ano, sendo o estado de Minas Gerais responsável por 33,16%, São Paulo e Rio Grande do Sul em conjunto responsáveis por 49,12% dessa produção (Napoleão, 2007). Por outro lado, o Brasil é considerado o maior produtor de mamão do mundo, com produção anual de 1,6 milhões de toneladas, sendo os estados da Bahia, Espírito Santo e Ceará responsáveis por 90% dessa produção. (IBGE, 2008). No entanto, doenças que incidem na fase de pós-colheita afetam negativamente os cultivos em aspectos relativos à qualidade e quantidade de frutos.

Os fungos são os principais causadores de doenças pós-colheita em frutas, como consequência do amplo número de espécies envolvidas e da diversidade e eficiência dos mecanismos de penetração (Snowdon, 1990).

As espécies *Rhizopus stolonifer* e *Colletotrichum gloesporioides* são considerados fungos de grande importância no setor agrícola, por se tratarem de microrganismos patógenos causadores principalmente, de doenças pós-colheita.

Rhizopus é um fungo cosmopolita que vive particularmente em regiões tropicais e subtropicais, em quase todo tipo de alimento fresco, úmido e parcialmente seco. A espécie mais comumente encontrada é o *Rhizopus stolonifer*, classe Zygomycetes, ordem Mucorales, sendo as espécies dessa ordem

que mais predominam em alimentos. Morfológicamente são fungos não septados, com micélios cotonosos e formando esporangióforos nos nódulos onde se encontram os rizóides. Seus esporângios são usualmente muito grandes e negros e suas columelas são hemisféricas. A característica primordial do *Rhizopus stolonifer* é o excessivo crescimento a 25°C, sendo o esporângio primeiramente branco, havendo mudança para preto com o amadurecimento. O crescimento a 5°C e 37°C é fraco ou ausente. As micotoxinas possivelmente envolvidas não estão bem esclarecidas (Pitt & Hocking, 1997).

Trata-se de fungos altamente destrutíveis, com grande capacidade saprofítica, exigindo ferimentos para sua penetração e rapidamente colonizam o fruto causando uma podridão mole e aquosa, geralmente não se manifestando em frutos, imaturos e raramente são vistos no campo (Alvarez & Nishijima, 1987; Rezende & Fancelli, 1997; Paull et al., 1997). Crescem principalmente em pães, mas desenvolvem-se também em vegetais, frutas, queijos e outros alimentos (Araújo, 2005).

Os fungos do gênero *Colletotrichum* são fitopatógenos importantes nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. São causadores de uma diversidade de doenças como antracnose, podridão de pedúnculo, varicela em manga, abacate e mamão (Bailey & Jeger, 1992). A espécie mais comumente encontrada é o *Colletotrichum gloesporioides*, da classe Coelomycetes, ordem Melanconiales, cuja forma sexuada corresponde a *Glomerella cingulata*. Morfológicamente são fungos não septados, com micélios cotonosos (Pitt & Hocking, 1991).

A temperatura ideal para que ocorra a infecção no hospedeiro é de 22 °C a 25 °C. Na temperatura de 30 °C ocorre o melhor crescimento, esporulação e germinação. À medida que a temperatura diminui, o crescimento é reduzido proporcionalmente, atingindo o mínimo a 4,5 °C. Em locais com umidade

relativa do ar inferior a 50%, o crescimento do fungo é retardado ou paralisado (Frupe, 1996).

A redução dessas perdas pós-colheita na cadeia produtiva de frutas representa um grande desafio, considerando que os frutos são órgãos que apresentam um alto teor de água e nutrientes e, mesmo após a colheita até a senescência, mantêm vários processos biológicos em atividade apresentando dessa forma maior predisposição a distúrbios fisiológicos, danos mecânicos e ocorrência de podridões (Kader, 2002; Forte & Osório, 2003).

Apesar das excelentes características sensoriais, o morango é um fruto altamente perecível e susceptível a patógenos causadores de doenças (Dias et al., 2005), sendo as deteriorações causadas por *Botrytis cinerea* e *Rhizopus stolonifer* as que causam perdas acentuadas em pós-colheita (Dias et al., 2007).

O mamão é um fruto que se caracteriza por uma vida pós-colheita relativamente curta, completando o seu amadurecimento em aproximadamente uma semana sob condições ambientes. No entanto, vários fatores de pré e pós-colheita, como patógenos, podem reduzir a sua vida pós-colheita (Costa & Balbino, 2002)

O uso de fungicidas químicos é um dos métodos mais utilizados para controlar as doenças de plantas. Entretanto, há uma grande limitação sobre aspectos de segurança dos mesmos em função dos possíveis efeitos carcinogênicos e teratogênicos bem como, toxicidade residual (Skandamis et. al., 2001; Eckert et al., 1994;). Soma-se a este fato a preocupante realidade do progressivo surgimento de cepas microbianas resistentes a antimicrobianos em todos os campos de estudo da microbiologia induzido por utilização abusiva desses compostos que exercem pressão para o surgimento do fenômeno de resistência. (Teuber, 1999; Andremon, 2001).

Plantas aromáticas e condimentares têm sido tradicionalmente utilizadas na medicina, bem como para aumentar a vida útil dos alimentos, mostrando

inibição contra bactérias, fungos filamentosos e leveduras. Suas principais características são devidas principalmente, aos óleos essenciais. (Sartoratto et al., 2004; Nychas 1995; Araújo, 2005; Reddy et al., 1998 e Schwan-Estrada et al., 2000).

Os óleos essenciais, também chamados de óleos voláteis ou etéreos, são líquidos oleosos aromáticos obtidos de material vegetal (flores, brotos, sementes, folhas, ramos, madeira, frutas e raízes). Eles podem ser obtidos por prensagem, enfloração ou extração, mas o método de destilação a vapor é o mais usado para a obtenção comercial de óleos essenciais (Burt, 2004).

De forma geral, são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas. Entretanto, sua principal característica é a volatilidade, diferindo assim dos óleos fixos, mistura de substâncias lipídicas, obtidos geralmente de sementes (Pereira, 2006).

Eles podem possuir mais de sessenta componentes individuais (Senatore, 1996; Russo et al., 1998) e os principais podem constituir até 85% do óleo, considerando que os outros componentes só estão presentes como traço (Senatore, 1996). Seus constituintes variam desde hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas e cumarinas, até compostos com enxofre (Simões et al., 2004).

Dentre os vários óleos essenciais destacam-se os condimentares. Zaika (1988) cita que especiarias e ervas podem ser agrupadas de acordo com a sua atividade antimicrobiana, sendo que a canela, cravo, mostarda e alho são mencionados como fortes inibidores para uma variedade de microorganismos. As propriedades inibitórias significativas também têm sido relatadas para o cominho, orégano, alecrim, sálvia, tomilho, dentre outras, como pode ser observado, alguns exemplos com seus respectivos principais princípios ativos, no quadro abaixo:

Nome popular	Nome científico	Família	Principais princípios ativos
Alecrim	<i>Lantana microphylla-Martius</i>	<i>Verbenaceae</i>	Linalool
Alho	<i>Allium sativum L.</i>	<i>Liliaceae</i>	Alicina, ajoeno e inulina
Canela	<i>Cinnamomum zeylanicum</i> Ness	<i>Lauraceae</i>	Aldeído cinâmico, eugenol, felandreno
Cravo-da-índia	<i>Caryophyllus aromaticus L.</i>	<i>Mirtaceae</i>	Eugenol, cariofileno
Erva-doce	<i>Pimpinella anisum</i>	<i>Umbelliferae</i>	Anetol
Manjeriço	<i>Ocimum basilicum</i>	<i>Lauraceae</i>	Linalool
Menta	<i>Mentha piperita</i>	<i>Labiatae</i>	Mentol
Orégano	<i>Origanum vulgare L.</i>	<i>Labiatae</i>	Carvacrol, timol
Tomilho	<i>Thymus vulgare L.</i>	<i>Labiatae</i>	Timol, carvacrol, cimeno,

O mecanismo de ação desses compostos sobre os microrganismos está relacionado à hidrofobicidade que permite quebrar os lipídeos da membrana celular e da mitocôndria, alterando as estruturas e tornando-as mais permeáveis, acarretando em vazamento de íons e outros conteúdos celulares (Sikkema et al., 1994; Carson et al., 2002; Ultee et al., 2002; Burt, 2004).

A composição do óleo essencial de uma planta é determinada geneticamente, sendo, geralmente, específica para determinado órgão e característica do seu estágio de desenvolvimento. Contudo, as condições ambientais são capazes de causar variações, como a influência do ciclo vegetativo, em que a concentração de cada um dos constituintes do óleo pode variar durante o desenvolvimento do vegetal. O ambiente no qual o vegetal se desenvolve e o tipo de cultivo também influenciam a composição química dos óleos essenciais (Willians & Stockley, 1998; Burt, 2004). Sua composição também pode diferir entre as estações de colheitas e condições geográficas (Cosentino et al., 1999; Faleiro et al., 2002).

Os óleos essenciais são voláteis, sendo necessário seu armazenamento em recipientes herméticos em ausência de luz, para prevenir a ocorrência de mudanças em sua composição.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDREMONT, A. The future control of bacterial resistance to antimicrobial agents. **American Journal of Infect Control**, St. Louis, v. 29, n. 4, p. 256-258, Aug. 2001.

ARAUJO, R. de C. Z. **Embalagens ativas com ervas aromáticas e condimentares na conservação de pães artesanais**. 2005. 88 p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

BAILEY, A. J.; JEGER, J. M. **Colletotrichum**: biology, pathology and control Oxford: British Society for Plant Pathology, 1992. 388 p.

BAILEY, J.A.; O'CONNELL, R.J.; PRING, R.J.; NASH, C. Infection strategies of *Colletotrichum* species. In: BAILEY, A. J.; JEGER, J. M. **Colletotrichum**: biology, pathology and control. Oxford: British Society for Plant Pathology, 1992. p. 88-120.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. **International Journal Food Microbiology**, Amsterdam, v. 94, n. 3, p. 223-253, Aug. 2004.

CARSON, C. F.; MEE, B. J.; RILEY, T. V. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 46, n. 6, p. 1914-1920, June 2002.

COSENTINO, S.; TUBEROSO, C. I. G.; PISANO, B.; SATTA, M.; MASCIA, V.; ARZEDI, E.; PALMAS, F. In vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 29, n. 2, p. 130-135, Aug. 1999.

COSTA, A. de F. S. da; BALBINO, J. M. de S. Características da fruta para exportação e normas de qualidade. In: FOLEGATTI, M. I. da S.; MATSUURA, F. C. A. U. **Mamão**: pós-colheita. Brasília: EMBRAPA-Mandioca e Fruticultura Tropical, 2002. 59 p. (Frutas do Brasil, 21)

DIAS, M. S. C; CANUTO, R. S; SANTOS, L. O.; MARTINS, R. N. Doenças do morango. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.26, n.228, p.40-43, 2005.

DIAS, M. S. C; COSTA, H.; CANUTO, R. S. Manejo de doenças do morangueiro. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.28, n.236, p.64-77, jan./fev. 2007

ECKERT, J. W.; SIEVERT, J. R.; RATNAYAKE, M. Reduction of imazalil effectiveness against citrus green mold in California packinghouses by resistant biotypes of *Penicillium digitatum*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 78, n. 10, p.791–794, Oct. 1994.

FALEIRO, M. L.; MIGUEL, M. G.; LADEIRO, F.; VENANCIO, F.; TAVARES, R.; BRITO, J. C.; FIGUEIREDO, A. C.; BARROSO, J. G.; PEDRO, L. G. Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species of *Thymus*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 36, n. 1, p. 35-40, 2002.

FERNANDES, M. S. Perspectivas de mercado da fruta brasileira. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 19., 2006, Cabo Frio. Frutas no Brasil: Saúde para o mundo: **Palestras e resumos...** Viçosa, MG: Jard, 2006. p. 4-12.

FORTES, J. F; COUTO, M. E. Doenças fúngicas e bacterianas. In: FORTES, J. F. OSÓRIO, V. A. (Ed.). **Morango: fitossanidade**, Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. p. 11-18. (Frutas do Brasil, 41).

FRUTOS E DERIVADOS. São Paulo: IBRAF, 2006. Mensal.

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

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção agrícola municipal**. Rio de Janeiro: IBGE, 2008. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em 14 de fev. 2008

KADER, A. (Ed.). **Postharvest Technology of Horticultural Crops**. 3. ed. Riverside: UC Regents, 2002. 535 p.

NAPOLEÃO, B. A. Morango: conquistando novas fronteiras. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 28, n. 236, jan./fev. 2007

NYCHAS, G. J. E. Natural antimicrobials from plants. In: GOULD, G. W. **New methods of food preservation**. London: Blackie Academic and Professional, 1995. p. 58–89.

PEREIRA, M. C.; VILELA, G. R.; COSTA, L. M. A. S.; SILVA, R. F.; FERNANDES, A. F.; FONSECA, E. W. S.; PICCOLI, R. H. Inibição do desenvolvimento fúngico através da utilização de óleos essenciais de condimento. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 4, p. 731-738, jul./ago. 2006.

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

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

REDDY, B. M. V.; ANGERS, P.; GOSSELING, A.; ARUL, J. Characterization and use of essential oil from *Thymus vulgaris* against *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer* in strawberry fruits. **Phytochemistry**, Oxford, v. 47, n. 8, p. 1515-1520, Aug. 1998.

RUSSO, M.; GALLETTI, G. C.; BOCCHINI, P.; CARNACINI, A. Essential oil chemical composition of wild populations of Italian oregano spice (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart): A preliminary evaluation of their use in chemotaxonomy by cluster analysis: 1. Inflorescences. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 46, n. 9, p. 3741-3746, Sept. 1998.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A. L. M.; DELARMELINA, C.; FIGUEIRA, G. M.; DUARTE, M. C. T.; REHDER, V. L. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 35, n. 4, p. 275-280, Oct./Dec. 2004.

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

SENATORE, F. Influence of harvesting time on yield and composition of the essential oil of a thyme (*Thymus pulegioides* L.) growing wild in Campania (Southern Italy). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 44, n. 5, p. 1327-1332, May 1996.

SIKKEMA, J.; BONT, J. A. M. de; POOLMAN, B. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. **Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 269, n. 11, p. 8022–8028, Mar. 1994.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: UFSC, 2004. 1102 p.

SKANDAMIS, P.; KOUTSOUMANIS, K.; FASSEAS, K.; NYCHAS, G. J. E. Inhibition of oregano essential oil and EDTA on *E.coli* 0157:H7. **Italian Journal of Food Science**, Pinerolo, v. 13, n. 1, p. 55-65, 2001.

SNOWDON, A. L. **A Colour Atlas of Post-harvest Diseases and Disorders of Fruits and Vegetables**: fruits and general introduction. London: Wolfe Scientific, 1990. v. 1, 302 p.

TEUBER, M. Spread of antibiotic resistance with food-borne pathogens. **Cellular and Molecular Life Science**, Basel, v. 56, n. 9/10, p. 755-763, 1999.

ULTEE, A.; SMID, E. J. Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 64, n. 3, p. 373–378, Mar. 2001.

ZAICA, L. L. Spices and Herbs: Their antimicrobial activity and its determination. **Journal of Food Safety**, Trumbull, v. 9, n. 2, p. 97-118, 1988.

WILLIAMS, L. R.; STOCKLEY, W. Essential oil with high antimicrobial activity for therapeutic use. **The International Journal of Aromatherapy**, Amsterdam, v. 8, n. 4, p. 30-40, Oct./Dec. 1998.

CAPITULO 1

Efeito *in vitro* e *in vivo* dos óleos essenciais de condimentos sobre o desenvolvimento micelial e esporulação de fungos em frutos de morango (*Fragaria ssp.*)

Efeito *in vitro* e *in vivo* dos óleos essenciais de condimentos sobre o desenvolvimento micelial e esporulação de fungos em frutos de morango (*Fragaria spp.*)

(Preparado de acordo com as normas da revista “Ciência e Agrotecnologia”)

FERNANDA CHAVES DA SILVA¹

SARA MARIA CHALFOUN²

HÉLCIO COSTA³

DEILA MAGNA DOS SANTOS BOTELHO⁴

WILLIAN PEREIRA MACIEL⁵

MARCELO CLAÚDIO PEREIRA⁶

¹ Economista Doméstica, mestranda em Microbiologia Agrícola/DBI , EPAMIG, Universidade Federal de Lavras, caixa postal 176, cep. 37200-000, Lavras, MG, Brasil. fernandachaves21@yahoo.com.br

² Doutora em Fitotecnia, EPAMIG, Universidade Federal de Lavras, caixa postal 176, cep. 37200-000, Lavras, MG, Brasil. chalfoun@ufla.br

³ Doutor em Fitopatologia, INCAPER, Secretaria de Agricultura, Centro Regional Centro Serrano. ROD.BR-262, KM 94. Fazenda do Estado. Cep. 29375-000. Venda Nova do Imigrante, ES, Brasil. helciocosta@incaper.es.gov.br

⁴ Doutora em Fitopatologia, EPAMIG, Universidade Federal de Lavras, caixa postal 176, cep. 37200-000, Lavras, MG, Brasil. deilamagna@hotmail.com

⁵ Estudante de Biologia, EPAMIG, Universidade Federal de Lavras, caixa postal 176, cep. 37200-000, Lavras, MG, Brasil. williammaciel@gmail.com

⁶ Mestre em Ciências dos Alimentos, EPAMIG, Universidade Federal de Lavras, caixa postal 176, cep. 37200-000, Lavras, MG, Brasil. marcelo.claudio@posgrad.ufla.br

RESUMO

A atividade antifúngica de óleos essenciais de condimentos foi testada *in vitro* e *in vivo*, sobre o desenvolvimento micelial e esporulação de fungos que incidem na fase pós-colheita de frutos de morango. Foram testados *in vitro* os óleos essenciais, adicionados sobre o meio de cultura e sob a tampa das placas de Petri, de alecrim (*Lantana microphylla*), alho (*Allium sativum*), canela (*Cinnamomum spp.*), cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticus*), erva-doce (*Pimpinella anisum*), manjerição (*Ocimum basillium*), menta (*Mentha piperita*), orégano (*Origanum vulgare*) e tomilho (*Thymus vulgaris*), nas concentrações 500, 1000, 1500 e 2000 $\mu\text{g ml}^{-1}$, exceto para o cravo-da-índia em que se testaram as concentrações 200, 400, 600, 800 $\mu\text{g ml}^{-1}$, além da testemunha e o álcool etílico. Nos testes *in vivo*, o experimento foi realizado em frutos obtidos nos sistemas de cultivo orgânico e convencional, sendo, os óleos essenciais selecionados conforme sua eficiência *in vitro*, além do uso do fungicida procimidone e o álcool etílico. Como cultura teste utilizou-se o fungo *Rhizopus stolonifer* obtido de frutos de morango, adquiridos no mercado local de Lavras, MG. Observou-se que os óleos essenciais apresentaram efeito inibitório significativo sobre o desenvolvimento micelial e esporulação *in vitro* e *in vivo* principalmente, quando adicionados sob a tampa da placa de Petri, destacando-se os óleos essenciais de erva-doce, orégano e tomilho nas concentrações 1500, 2000 e 2000 $\mu\text{g ml}^{-1}$, respectivamente. Verifica-se, portanto, que os óleos essenciais de condimentos exercem ação antifúngica e podem ser aplicados no controle de patógenos que incidem sobre frutos de morango na fase pós-colheita.

TERMOS PARA INDEXAÇÃO: Atividade antimicrobiana, Microrganismos, Conservantes naturais, Segurança alimentar.

ABSTRACT

Effect *in vitro* and *in vivo* of spices essential oils over the fungi mycelial development and sporulation in strawberries fruits (*Fragaria spp.*)

The antifungal activity of spices's essential oils was tested *in vitro* and *in vivo*, over the mycelial development and sporulation of fungi that occurs in the posharvest phase of strawberries fruits. It was tested *in vitro* the essential oils, over the culture means and under the Petri plate's lid, of rosemary (*Lantana microphylla*), garlic (*allium sativum*), cinnamon (*Cinnamomun spp.*), clove (*Caryophyllus aromaticus*), anise (*Pimpinella anisum*), basil (*Ocimum basillium*), mint (*Mentha piperita*), oregano (*Origanum vulgare*) and thyme (*Thymus vulgaris*) in 0, 500, 1000, 1500 and 2000 $\mu\text{g ml}^{-1}$ concentrations, except to the clove (*Caryophyllus aromaticus*) where was tested concentrations of 0, 200, 400, 600 and 800 $\mu\text{g ml}^{-1}$, besides of witness and the ethil alcohol. In the *in vivo* test the experiment was done in fruits obtained at organic and conventional cultivations systems, being the essential oils selected according to its *in vivo* efficiency, besides the use of fungicide procimidone and absolute ethil alcohol. The test fungi culture was *Rhizopus stolonifer*, obtained from strawberries fruits, collected in the local market of Lavras, Minas Gerais state. It was observed that the essential oils present a significant inhibitory effect over the mycelia development and sporutalion *in vitro* and *in vivo*, mainly when added under the Petri plate's lid, highlighting it the anise, oregano and thyme essential oils in 1500, 2000, 2000 $\mu\text{g ml}^{-1}$, respectively. It was check, therefore, that spices's essential oils exercise antifungal action and can be applied in the pathogen control that occurs over strawberries fruits in posharvest phase.

INDEX TERMS: Antimicrobial activity, Microorganism, Natural preservatives, Food safety.

INTRODUÇÃO

No cenário mundial da fruticultura, o cultivo de morango contribui com uma produção anual de cerca de 100 mil toneladas, com área ocupada de 3500 hectares. Minas Gerais contribui com 33,16% do total de morangos produzidos no Brasil, enquanto São Paulo e Rio Grande do Sul são responsáveis, juntos, por 49,12% dessa produção (Napoleão, 2007). Entretanto, doenças pós-colheita afetam diretamente essa cultura e são favorecidas por injúrias mecânicas durante tratamentos culturais, irrigação e colheita (Dias et al., 2005).

A redução das perdas pós-colheita na cadeia produtiva de frutas representa um grande desafio, considerando que as frutas são órgãos que apresentam alto teor de água e nutrientes e, mesmo após a colheita até a senescência, mantêm vários processos biológicos em atividade, apresentando desta forma maior predisposição a distúrbios fisiológicos, danos mecânicos e ocorrência de podridões. (Kader, 2002; Fortes & Couto, 2003; Tanaka et al., 2002).

Apesar das excelentes características sensoriais, o morango é um fruto altamente perecível e susceptível a patógenos causadores de doenças, (Dias et al., 2005) sendo as deteriorações causadas por *Botrytis cinerea* e *Rhizopus stolonifer* as que causam perdas acentuadas em pós-colheita (Dias et al., 2007).

O uso de fungicidas é um dos métodos mais utilizados para controlar as doenças de plantas. Entretanto, há uma grande limitação sobre aspectos de segurança dos mesmos em função dos possíveis efeitos carcinogênicos e teratogênicos bem como, toxicidade residual (Skandamis et. al., 2001; Eckert et al., 1994;). Soma-se a este fato, a preocupante realidade da progressiva seleção de cepas microbianas resistentes a antimicrobianos em todos os campos de estudo da microbiologia induzido por utilização abusiva desses compostos

que levam ao surgimento do fenômeno de resistência. (Teuber, 1999; Andremont, 2001).

Plantas aromáticas e condimentares têm sido tradicionalmente utilizadas na medicina, bem como para aumentar a vida útil dos alimentos, mostrando inibição contra bactérias, fungos filamentosos e leveduras. Suas principais propriedades são em consequência dos óleos essenciais produzidos pelo metabolismo secundário (Sartoratto et al., 2004; Nychas 1995; Araújo, 2005; Reddy et al., 1998 & Schwan-Estrada et al., 2000).

Vários estudos têm evidenciado que os princípios ativos dos condimentos localizam-se na fração óleo essencial (Parry, 1962; Hitokoto et al., 1980; Pruthi, 1980, Farag et al., 1989; Koketsu e Gonçalves, 1991; Patkar et al., 1993; Mahmoud, 1994)

Dessa forma, neste estudo, objetivou-se verificar a atividade antifúngica *in vitro* e *in vivo* de alguns óleos essenciais obtidos de condimentos como alecrim (*Lantana microphylla*), alho (*Allium sativum*), canela (*Cinnamomum spp.*), cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticus*), erva-doce (*Pimpinella anisum*), manjerição (*Ocimum basillium*), menta (*Mentha piperita*), orégano (*Origanum vulgare*) e tomilho (*Thymus vulgaris*) sobre o desenvolvimento micelial e esporulação de fungos que incidem no estágio pós-colheita em frutos de morango.

MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Ensaio dos óleos essenciais de alecrim, alho, canela, erva-doce, manjerição, menta, orégano, tomilho sobre o desenvolvimento do fungo *Rhizopus stolonifer* *in vitro*

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório do EcoCentro da EPAMIG, localizado no município de Lavras, Minas Gerais.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com três repetições em arranjo no esquema fatorial $(8 \times 4 \times 2) + 2$, sendo oito óleos essenciais de condimentos (alecrim, alho, canela, erva-doce, manjerição, menta, orégano e tomilho), quatro concentrações (500, 1000, 1500, 2000 $\mu\text{g ml}^{-1}$) e dois métodos de adição dos óleos essenciais de condimentos (disco de papel de filtro contendo óleo essencial de condimento adicionado sobre o meio de cultura e sob a tampa da placa de Petri) mais dois tratamentos adicionais, a testemunha e o álcool etílico.

Os óleos essenciais de condimentos foram extraídos através da hidrodestilação (Simões e Spitzer, 2000) e diluídos em álcool etílico.

Como cultura de teste foi utilizada o fungo *Rhizopus stolonifer* isolado de frutos de morango, adquiridos no comércio local de Lavras, MG, purificados e identificados de acordo com Pitt & Hocking (1991).

O método utilizado foi o bioanalítico (Zaika, 1988), *in vitro*, observando o desenvolvimento ou inibição do fungo em diferentes concentrações dos óleos essenciais, usando o meio de cultura BDA (Batata-Dextrose Agar) adicionado de cloranfenicol, apropriado para o desenvolvimento do fungo. Ao meio de cultura autoclavado por 20 minutos a 120°C, após o resfriamento, foi adicionado o inóculo fúngico diluído para a concentração de $4,77 \times 10^4$ cél/cm³ de esporos,

obtido pelo método de filtração da massa fúngica por meio de gaze em água destilada estéril.

Posteriormente, o meio contendo o fungo foi vertido em placas de Petri com 9 cm de diâmetro. Após solidificação, discos de papel de filtro de 5 mm de diâmetro embebidos com 25 µl de óleos essenciais de alecrim (*Lantana microphylla*), alho (*Allium sativum*), canela (*Cinnamomum spp.*), erva-doce (*Pimpinella anisum*), manjeriço (*Ocimum basilicum*), menta (*Mentha piperita*), orégano (*Origanum vulgare*) e tomilho (*Thymus Vulgaris*), nas concentrações 500, 1000, 1500 e 2000 µg ml⁻¹ foram colocados sobre o meio de cultura e sob a tampa da placa de Petri. Placas com meio de cultura sem adição de óleos essenciais e discos de papel de filtro com álcool, adicionados sobre o meio de cultura, foram utilizados como controle para certificar-se dos efeitos inibitórios dos óleos essenciais. Todos os procedimentos foram realizados sob condições assépticas (capela de fluxo laminar mod. FL7752).

As placas foram vedadas hermeticamente e incubadas em câmara de crescimento – BOD (mod. 347CDG), com temperatura de 25°C, e fotoperíodo de 12 horas, durante 7 dias.

Após o sétimo dia de incubação, avaliou-se o desenvolvimento micelial e a esporulação. Para o desenvolvimento micelial adotou-se uma escala de notas, a saber: 0 (ausente); 1 (baixo); 2 (médio); 3 (alto). Para a contagem do número de esporos foi utilizada a Câmara de Newbauer.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as variáveis quantitativas significativas no teste F foram submetidas à análise de regressão e as qualitativas ao teste de médias, comparadas pelo teste de Scott e Knott (1974). Os dados foram analisados pelo programa estatístico, Sistema de Análise de Variância para Dados Balanceados - Sisvar, segundo Ferreira (2000).

2.2 Ensaio do óleo essencial de cravo-da-índia sobre o desenvolvimento do fungo *Rhizopus stolonifer* *in vitro*

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório do EcoCentro da EPAMIG, localizado no município de Lavras, Minas Gerais.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com três repetições e seis tratamentos, sendo quatro concentrações (200, 400, 600, 800 $\mu\text{g ml}^{-1}$), a testemunha e o álcool etílico como controle negativo.

A eficácia das diferentes concentrações do óleo essencial de cravo-da-índia foi avaliada por contraste com álcool e testemunha nos dois métodos estudados de adição do óleo (disco de papel de filtro contendo óleo essencial do condimento adicionado sobre o meio de cultura e sob a tampa da placa de Petri).

As etapas extração do óleo essencial, isolamento e identificação do fungo, procedimentos de instalação e avaliação do ensaio foram realizadas conforme descrito no item 2.1.

2.3 Ensaio dos óleos essenciais de condimentos sobre o desenvolvimento do fungo *Rhizopus stolonifer* *in vivo*

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Fitopatologia do Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural - INCAPER-CRDR-CS, localizado em Domingos Martins, ES.

Avaliaram-se dois sistemas de cultivo de morango, o cultivo convencional e o cultivo orgânico.

O delineamento experimental utilizado para o teste *in vivo* em cultivo convencional foi inteiramente casualizado com três repetições e nove tratamentos (alho, canela, erva-doce, menta, orégano, tomilho, fungicida, álcool etílico, testemunha).

Já para o cultivo orgânico o delineamento experimental foi o mesmo utilizado para o cultivo convencional com exceção do tratamento fungicida químico, totalizando oito tratamentos.

Os óleos essenciais utilizados foram extraídos pelo método da hidrodestilação (Simões & Sptizer, 2000) e diluídos em álcool etílico.

A cultivar de morango *Camarosa* nos dois sistemas de cultivo foi selecionada para o estudo.

Os frutos de morango sadios foram colhidos em caixas plásticas brancas e devidamente limpas e transportados ao Laboratório, onde foram selecionados e distribuídos em bandejas de isopor, com oito frutos por bandeja. A cada bandeja foram adicionados os óleos essenciais de alho ($2000 \mu\text{g ml}^{-1}$), canela ($1000 \mu\text{g ml}^{-1}$), erva-doce ($1500 \mu\text{g ml}^{-1}$), menta ($2000 \mu\text{g ml}^{-1}$), orégano ($2000 \mu\text{g ml}^{-1}$) e tomilho ($2000 \mu\text{g ml}^{-1}$) selecionados previamente pela sua eficácia *in vitro*, o fungicida químico de marca comercial sialex 500 (no cultivo convencional) e álcool etílico, todos em um volume de $2000 \mu\text{l}$ em chumaços de algodão colocados em tampas plásticas previamente esterilizadas sob radiação UV. Bandejas sem adição de óleos essenciais foram utilizadas como testemunha.

As bandejas foram embaladas com filme plástico PVC e armazenadas sobre bancadas previamente higienizadas com álcool 70%.

Avaliou-se a incidência de fungos em frutos de morango, durante 5 dias consecutivos, verificando-se o número de frutos doentes por bandeja, os quais foram convertidos em porcentagem.

Os dados foram analisados pelo programa estatístico, Sistema de Análise de Variância para Dados Balanceados - Sisvar, segundo Ferreira (2000) e as variáveis significativas no teste F foram submetidas ao teste de regressão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Efeito dos óleos essenciais de alecrim, alho, canela, erva-doce, manjerição, menta, orégano e tomilho sobre o desenvolvimento do fungo *Rhizopus stolonifer* sob condições *in vitro*

A variável desenvolvimento micelial do fungo *Rhizopus stolonifer* foi influenciada pela interação óleos essenciais versus concentração e óleos essenciais versus método de adição. Já para a esporulação observou-se interação significativa entre óleos essenciais, concentrações e método de adição, indicando a dependência entre esses fatores.

O contraste entre a média da testemunha e do álcool e os demais tratamentos apresentou diferença significativa tanto para o desenvolvimento micelial quanto para a esporulação, indicando que os tratamentos estudados exerceram influência positiva sobre o controle do fungo.

Para o desenvolvimento micelial do fungo *R. stolonifer* verificou-se que o óleo essencial de orégano adicionado sobre o meio de cultura apresentou a maior redução dessa variável. Já quando os óleos essenciais de condimentos foram adicionados sob a tampa da placa de Petri observou-se, que os óleos de tomilho, manjerição e alho apresentaram maior efeito na inibição do desenvolvimento micelial quando comparado aos demais (Tabela 1). Tais resultados concordam com aqueles obtidos por Viegas et al. (2005), em que os óleos essenciais de alho e canela foram tóxicos a dois isolados de fungos do grupo *Aspergillus flavus*. Pereira et al., (2006) ao avaliar a inibição do desenvolvimento micelial de *Fusarium sp.*, *Aspergillus ochraceus*, *A. niger* e *A. flavus* através de óleos essenciais de condimentos também verificaram que os óleos essenciais de alecrim, cebola, manjerição, menta e orégano inibiram o desenvolvimento desses fungos.

TABELA 1 Valores médios de notas do Desenvolvimento micelial do fungo *Rhizopus stolonifer* isolado do morango, submetidos a diferentes óleos essenciais de condimentos em dois métodos de adição do óleo (adicionado sobre o meio de cultura e sob a tampa da placa de Petri) *.

ÓLEOS ESSENCIAIS	MÉTODOS	
	Meio	Tampa
Alecrim	2,25b	2,66b
Alho	2,33b	2,08a
Canela	2,16b	2,33b
Erva-doce	2,66c	2,33b
Manjerição	2,16b	1,83a
Menta	2,91c	2,33b
Orégano	1,66a	2,25b
Tomilho	2,16b	1,66a

* Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste Scott Knott, a 5% de probabilidade. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Por outro lado, para a esporulação, observou-se que os óleos essenciais de condimentos apresentaram efeitos inibitórios diferenciados sobre o fungo, conforme o método de adição empregado nas concentrações testadas (Tabela 2).

O alho apresentou melhores resultados inibitórios quando o mesmo foi adicionado sobre o meio de cultura, nas concentrações 500, 1500 e 2000 $\mu\text{g ml}^{-1}$. O tratamento com canela nas concentrações de 500 e 1000 $\mu\text{g ml}^{-1}$ não apresentou diferença entre os métodos de adição empregados, contudo nas concentrações de 1500 e 2000 $\mu\text{g ml}^{-1}$ verificou-se um maior efeito inibitório da esporulação quando o óleo essencial foi adicionado sob a tampa da placa de Petri (Tabela 2).

Já os óleos essenciais de menta e tomilho apresentaram maior redução da esporulação quando colocados sob a tampa da placa de Petri nas concentrações 500, 1500, 2000 $\mu\text{g ml}^{-1}$ e 500, 1000 e 2000 $\mu\text{g ml}^{-1}$, respectivamente (Tabela 2). Efeito antifúngico semelhante foi relatado por Reddy (1998) que considerou o óleo essencial de tomilho um potencial volátil como conservante antifúngico para frutos de morango no que se refere aos patógenos *Botrytis cinerea* e *Rhizopus stolonifer*

Para os demais óleos essenciais verificou-se que o seu efeito sobre o fungo *Rhizopus stolonifer* oscilou conforme os diferentes métodos de adição dos óleos empregados bem como, as concentrações testadas.

De uma forma geral, os óleos essenciais apresentaram maior redução da esporulação do fungo quando adicionados sob a tampa da placa de Petri, exceto os óleos essenciais de manjerição e orégano que não tiveram sua ação inibitória influenciada pelos métodos de adição utilizados.

TABELA 2 Valores médios do número de esporos (cel/cm³) do fungo *Rhizopus stolonifer*, isolado de morango, submetidos a diferentes óleos essenciais de condimentos, concentrações e dois métodos de adição do óleo (adicionado sobre o meio de cultura e sob a tampa da placa de Petri). *

ÓLEOS ESSENCIAIS	CONCENTRAÇÕES (µg ml ⁻¹)							
	500		1000		1500		2000	
	Meio	Tampa	Meio	Tampa	Meio	Tampa	Meio	Tampa
Alecrim	18,85Ac	18,86Ae	23,42Ab	22,57Ac	20,69Bc	4,05Ab	24,94Bf	14,65Ab
Alho	26,50Bd	12,25Ac	28,56Bc	7,90Aa	24,17Bc	13,68Ac	22,09Be	5,89Aa
Canela	35,38Be	6,16Ab	22,92Bb	3,29Aa	13,78Ab	11,48Ac	0,00Aa	7,36Ba
Erva-doce	3,09Aa	14,49Bd	6,22Aa	7,81Aa	4,02Aa	11,78Bc	27,04Bf	15,36Ab
Manjeriço	10,04Ab	31,77Bf	5,64Aa	13,42Bb	11,95Ab	12,01Ac	4,26Ab	4,79Aa
Menta	11,68Bb	0,00Aa	5,48Aa	36,39Bb	9,02Ba	0,08Aa	13,26Ac	35,46Bc
Orégano	21,76Ac	19,34Ae	20,48Bb	10,26Ab	13,40Ab	18,08Bd	32,81Bg	12,20Ab
Tomilho	19,74Bc	5,21Ab	26,74Bc	5,06Aa	6,50Aa	5,02Ab	17,32Bd	5,28Aa

* Médias seguidas pelas mesmas letras, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas dentro da mesma concentração, não diferem estatisticamente pelo teste Scott Knott, a 5% de probabilidade. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Verificou-se, portanto, que os efeitos dos óleos essenciais sobre o desenvolvimento micelial e esporulação diferiram quando estes foram adicionados ao disco de papel de filtro e colocados sobre o meio de cultura e sob a tampa das placas de Petri.

Zaika (1988) relata que o método denominado, “Zona de inibição”, utilizado neste estudo tem a limitação de que seu efeito inibitório depende da habilidade de difusão do óleo essencial através do meio ágar. Estudo realizado por Moleyar e Narasimham, (2006), mostra a capacidade de detoxificação dos componentes dos óleos essenciais (mentol e citral) por *Aspergillus niger* e *Rhizopus stolonifer*, em que tal comportamento pode se estender aos outros microrganismos.

A interação entre as concentrações testadas e óleos essenciais foi demonstrada pelas análises de regressão, cujos resultados encontram-se representados no presente trabalho.

Com relação ao desenvolvimento micelial somente foi significativo para o óleo essencial de tomilho, verificando-se máxima esporulação na concentração de $1800 \mu\text{g ml}^{-1}$. Este resultado propõe a possibilidade de estudos com maiores concentrações deste óleo essencial (Figura 1).

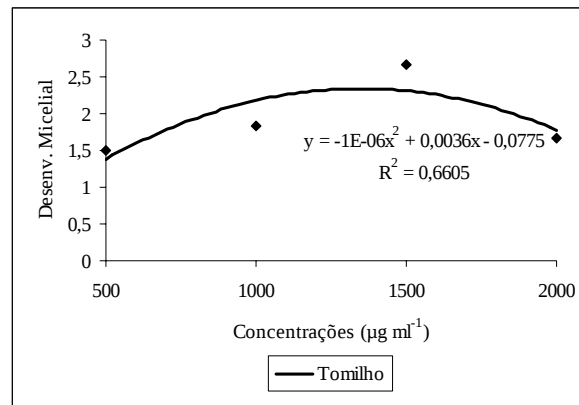


FIGURA 1 Efeito das concentrações do óleo essencial de tomilho sobre o desenvolvimento micelial do fungo *Rhizopus stolonifer*. Lavras, MG, 2008.

No desdobramento da interação das concentrações dentro de óleos essenciais de condimentos e métodos de adição do óleo observou-se efeito significativo de alguns óleos essenciais para a esporulação.

Observa-se na Figura 2, para o efeito dos óleos essenciais de condimentos sobre o meio de cultura com o fungo que os condimentos alho, canela, erva-doce, menta e tomilho, apresentaram índices de inibição da esporulação variáveis de acordo com as concentrações testadas.

Os resultados referentes de óleos essenciais de alho e tomilho apesar de apresentarem índices de correlação significativos com as concentrações testadas, demonstraram valores mínimos de esporulação na menor concentração testada. Já a canela apresentou interferência direta na esporulação, pois quanto maior a concentração do óleo maiores valores de esporulação foram observados (Figura 2). Resultado semelhante foi observado por Chalfoun et al., (2004) que relatou que este tipo de comportamento requer um estudo específico por se tratar de

vários fatores como: tipo de substrato, reação do fungo ao substrato e diferentes tipos de compostos que podem interferir sobre o comportamento do fungo.

Para a menta, a inibição da esporulação de *R. stolonifer*, ocorreu a partir da concentração de 1038 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Resultados semelhantes foram alcançados por Sartoratto et al., (2004) que avaliaram a atividade antimicrobiana *in vitro* de óleos essenciais, dentre esses, a menta sobre bactérias deterioradoras de alimentos e a levedura *Candida albicans* verificando a eficácia deste óleo sobre o desenvolvimento desses microrganismos. Por outro lado, o óleo essencial de erva-doce apresentou redução da esporulação no intervalo de 500 a 1179 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (Figura 2).

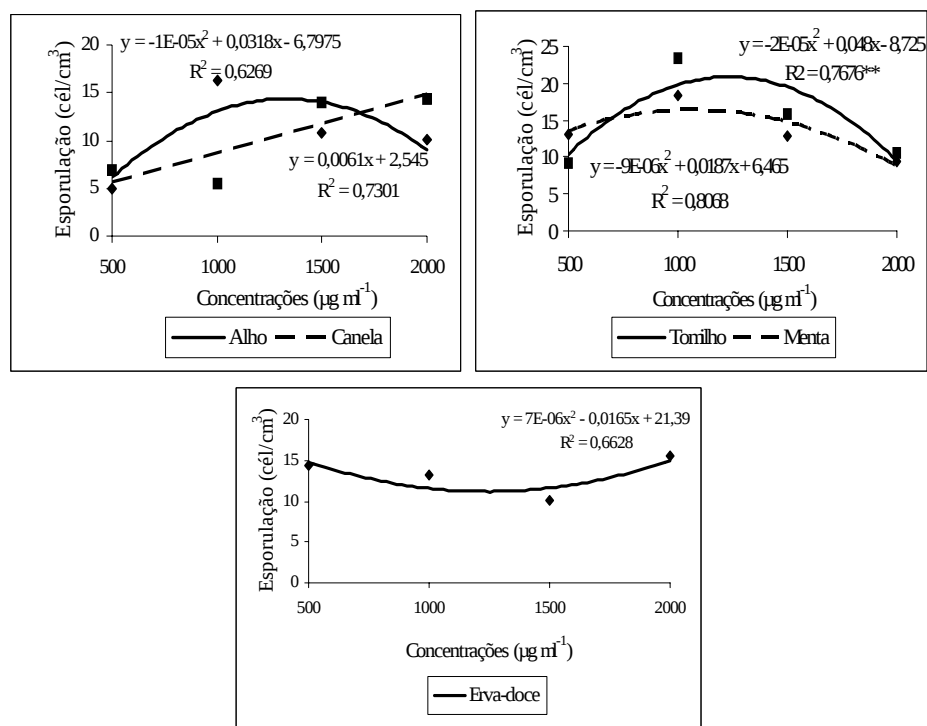


FIGURA 2 Efeito das concentrações dos óleos essenciais de alho, canela, tomilho, menta e erva-doce quando adicionados sobre o meio de cultura com o fungo na esporulação do fungo *Rhizopus stolonifer*. Lavras, MG, 2008.

Para o efeito de adição do óleo essencial em papel de filtro colocado sob a tampa das placas de Petri, verificou-se que o alho, canela, erva-doce, menta e orégano apresentaram efeito inibitório significativo sobre a esporulação fungo (Figura 3).

O óleo essencial de alho apresentou efeito inibitório da esporulação de *R. stolonifer* a partir da concentração de $961 \mu\text{g ml}^{-1}$ até a concentração final testada, sendo que resultado semelhante foi encontrado por Benkeblia (2004), que verificou o controle dos fungos *Aspergillus niger*, *Penicillium cyclopium* e *Fusarium oxysporum* pelo ao óleo essencial de alho utilizado nas concentrações de 50, 100, 200, 300 e 500 ml/l (Figura 3).

O condimento canela foi eficiente na redução da esporulação no intervalo de 500 a $1607 \mu\text{g ml}^{-1}$, verificando-se a partir dessa concentração, um aumento na esporulação. Já o óleo de erva-doce proporcionou uma redução linear dessa variável analisada (Figura 3).

Para os óleos essenciais de menta e orégano verificou-se efeito significativo sobre a esporulação do fungo a partir da concentração de $892 \mu\text{g ml}^{-1}$ e $1000 \mu\text{g ml}^{-1}$, respectivamente até a concentração final testada. Um estudo semelhante foi realizado por Shain et al., (2003), em que avaliaram a efetividade do óleo essencial de orégano sobre bactérias patogênicas de alimentos e verificou-se que o óleo essencial de orégano inibiu a grande maioria das bactérias, sendo que a CMI do óleo oscilou entre $15,62$ a $125 \mu\text{g ml}^{-1}$ (Figura 3).

Pereira (2001) relata que o efeito inibidor da esporulação aumenta a eficiência dos tratamentos, uma vez que, mesmo que o fungo apresente um determinado grau de desenvolvimento micelial, a redução de sua esporulação reduz o seu potencial de inoculo.

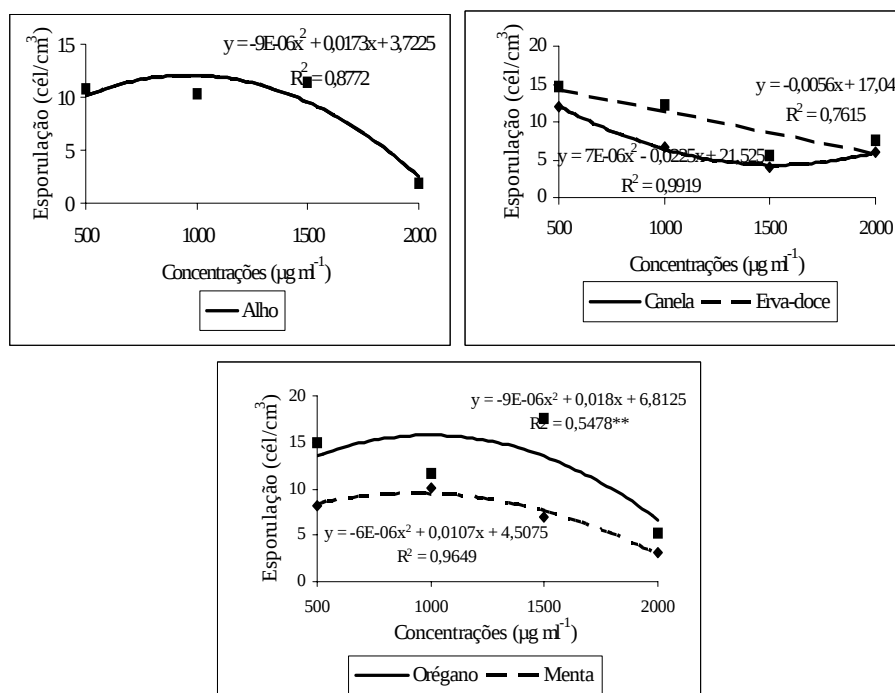


FIGURA 3 Efeito das concentrações dos óleos essenciais de alho, canela, erva-doce, orégano e menta quando adicionados sob a tampa das placas de Petri na esporulação do fungo *Rhizopus stolonifer*. Lavras, MG, 2008.

3.2 Ensaio do óleo essencial de cravo-da-índia sobre o desenvolvimento do fungo *Rhizopus stolonifer* sob condições *in vitro*.

O óleo essencial de cravo-da-índia conforme, vários relatos da literatura (Núñez et al., 2001; Pereira 2001; Beniss et al., 2004; Amaral et al., 2005) apresenta grande eficiência como um agente antimicrobiano, o que justifica o uso de concentrações inferiores aos demais e seu estudo separadamente.

A influência do óleo essencial obtido do cravo-da-índia no desenvolvimento micelial e na esporulação, quando adicionado sobre o meio de cultura e sob a tampa da placa de Petri, demonstrados pelo contraste de médias

entre as concentrações, testemunha e álcool são apresentados nas Figuras 4, 5, 6 e 7 respectivamente.

Na Figura 4, verifica-se que para o desenvolvimento micelial do fungo, o óleo essencial de cravo-da-índia, quando adicionado sobre o meio de cultura, apresentou índice de inibição significativo ao ser comparado à testemunha e ao controle negativo (álcool etílico), concordante como o relatado por Amaral & Bara (2005), em que o óleo de cravo apresentou ação fungicida nas concentrações de 0,1% a 0,5% sobre fungos fitopatogênicos de sementes de arroz, soja, milho e feijão.

Já para a esporulação, as concentrações testadas do óleo essencial de cravo-da-índia não diferiram significativamente da testemunha e do álcool (Figura 5). Resultado semelhante foi relatado por Araújo (2005), que verificou o mesmo comportamento do óleo essencial de cravo-da-índia sobre a esporulação de *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium roqueforti* e *Rhizopus stolonifer*.

O álcool apesar de ser um agente antimicrobiano não mostrou efeito inibitório significativo ao ser comparado à testemunha, tanto para o desenvolvimento micelial como para a esporulação. (Figuras 4 e 5)

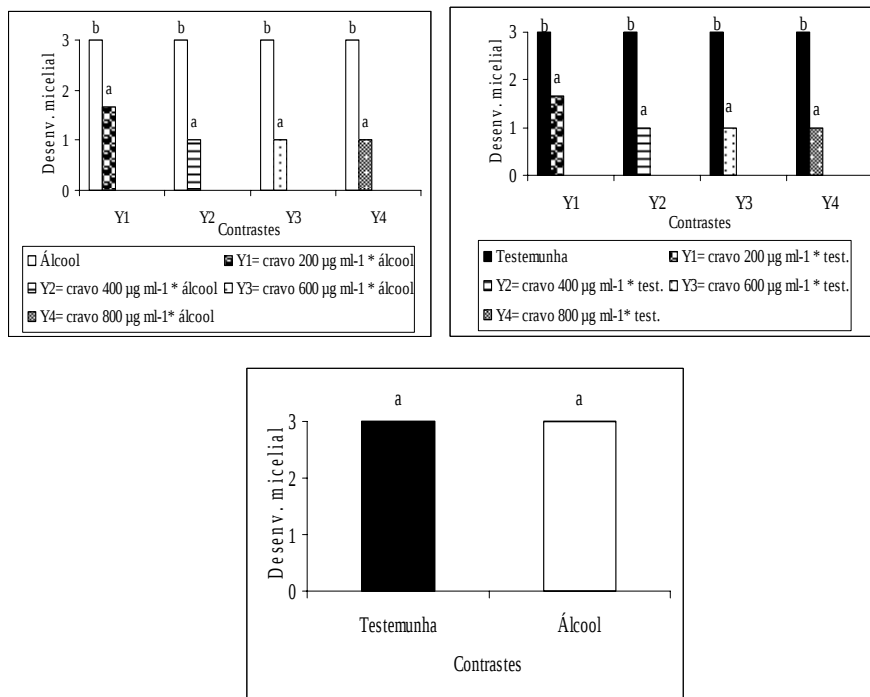


FIGURA 4 Contraste das médias de controle do fungo *Rhizopus stolonifer* expresso em média geral do desenvolvimento micelial quando submetido ao tratamento com óleo essencial de cravo-da-índia adicionado sobre o meio de cultura com o fungo. UFLA, Lavras, MG, 2008.

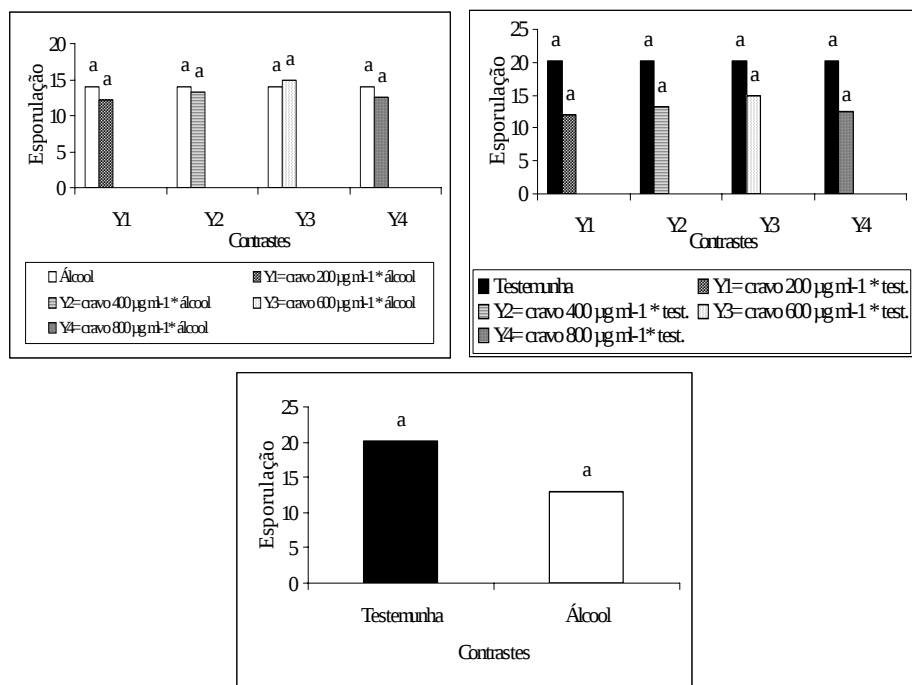


FIGURA 5 Contraste das médias de controle do fungo *Rhizopus stolonifer* expresso em média geral de esporos quando submetido ao tratamento com óleo essencial de cravo-da-índia adicionado sobre o meio de cultura com o fungo. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Na Figura 6, quando o óleo essencial de cravo-da-índia foi adicionado sob a tampa da placa de Petri, observou-se que o desenvolvimento micelial não diferiu quando comparado às diferentes concentrações do óleo de cravo-da-índia com a testemunha e o álcool.

Por outro lado, para a esporulação verificou-se que o óleo essencial de cravo-da-índia apresentou efeito inibitório sobre a esporulação do fungo quando comparado ao álcool etílico e à testemunha, exceto na concentração de 600 µg ml⁻¹ na qual o cravo teve efeito equivalente ao do álcool (Figura 7), concordando

com resultado encontrado por Pereira (2001) que verificou o efeito antifúngico do cravo-da-índia sobre a esporulação dos fungos *Aspergillus niger*, *Rhizopus* sp., *Eurotium repens* e *Penicillium* spp.

Comparando-se a testemunha e o álcool etílico para a esporulação verificou-se que o álcool apresentou efeitos antifúngicos.

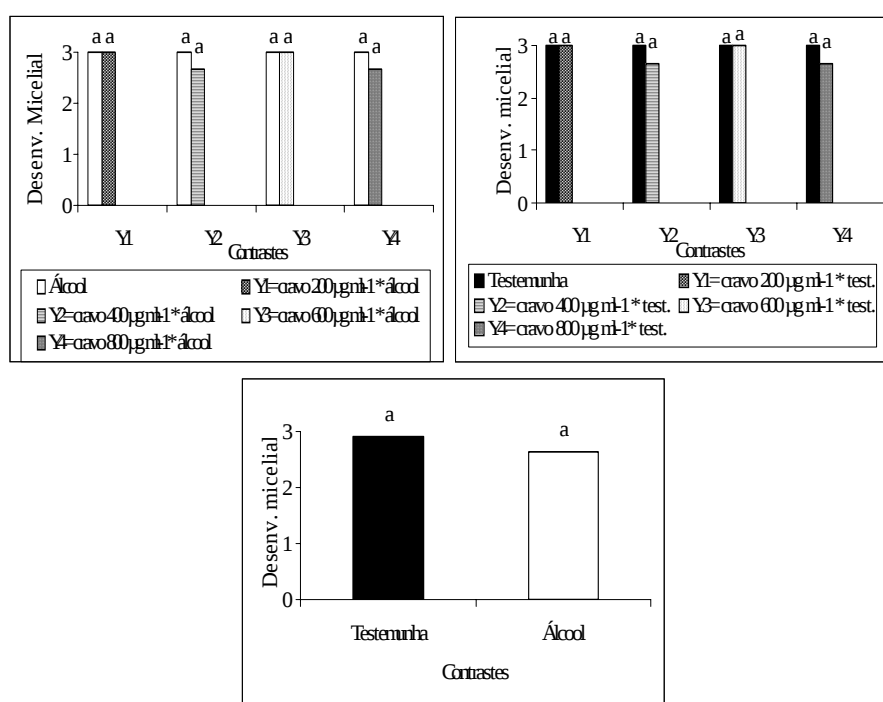


FIGURA 6 Contraste das médias de controle do fungo *Rhizopus stolonifer* expresso em média geral do desenvolvimento micelial quando submetido ao tratamento com óleo essencial de cravo-da-índia adicionado sob a tampa das placas de Petri. UFLA, Lavras, MG, 2008.

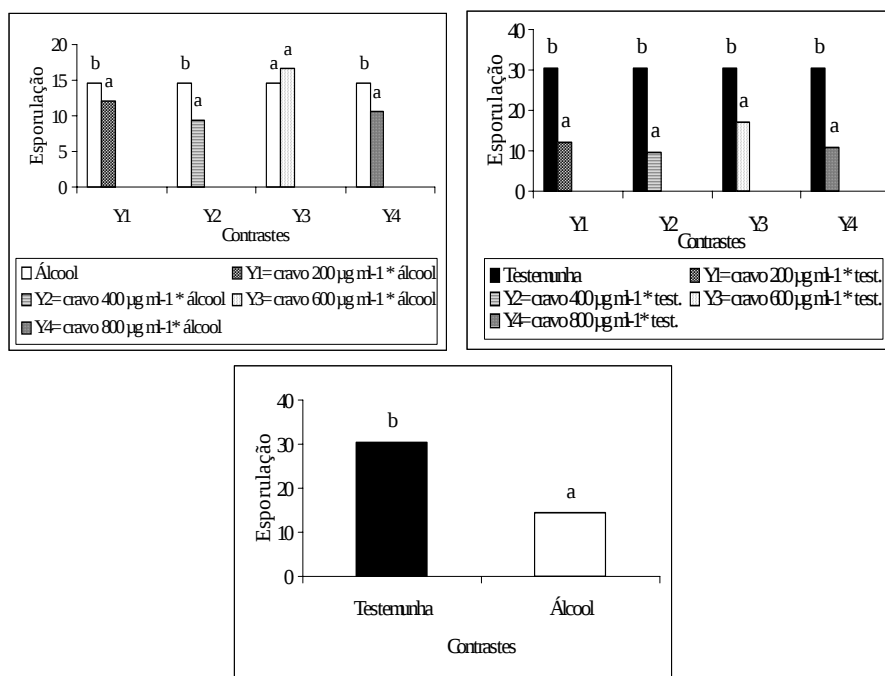


FIGURA 7 Contraste das médias de controle do fungo *Rhizopus stolonifer* expresso em média geral de esporos quando submetido ao tratamento com óleo essencial do condimento cravo-da-índia adicionado a tampa das placas de Petri. UFLA, Lavras, MG, 2008.

3.3 Efeito inibitório *in vivo* de óleos essenciais de condimentos no controle de fungos na fase pós-colheita de frutos de morango

Os óleos essenciais dos condimentos alecrim, alho, canela, erva-doce, menta, orégano e tomilho, selecionados com base nos resultados obtidos nos testes *in vitro* do presente estudo, foram testados *in vivo* visando à conservação pós-colheita de frutos de morango, cultivar *Camarosa*, obtidos em cultivo orgânico e convencional, localizados no município de Domingos Martins, ES.

As concentrações dos condimentos foram selecionadas com base na CMI (concentração mínima inibitória) para o desenvolvimento micelial e esporulação de cada condimento, prevalecendo a maior dose necessária para o controle dos processos.

Embora nos estudos *in vitro*, os testes dos óleos essenciais de condimentos tenham sido efetuadas visando ao fungo *R. stolonifer* a segunda etapa, *in vivo*, referiu-se ao efeito sobre o conjunto de fungos que ocorreram na fase pós-colheita, uma vez que trabalhou-se com uma inoculação natural. Os principais fungos observados, além do *Rhizopus stolonifer* foram o *Botrytis cinerea* e *Colletotrichum acutatum*

No cultivo orgânico (Figura 8), observou-se que o efeito inibitório dos óleos essenciais de condimentos não apresentou diferença significativa ao longo dos dias sobre a incidência de fungos nos frutos. Contudo, verifica-se que o aumento da incidência de fungos foi proporcional ao aumento dos dias.

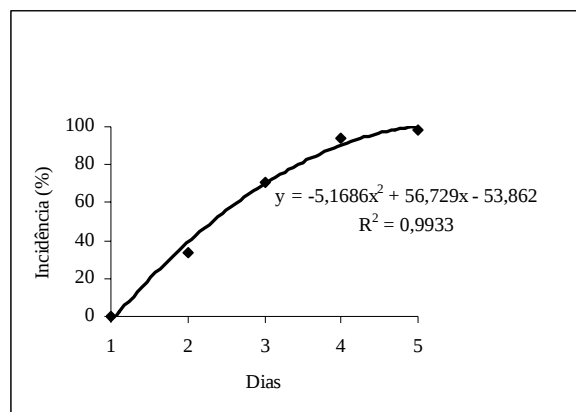


FIGURA 8 Incidência de fungos em frutos de morango, obtidos do cultivo orgânico no período pós-colheita. Domingos Martins, ES, 2008.

Para o cultivo convencional observou-se que somente os óleos essenciais de alho, canela, erva-doce, menta, orégano, tomilho e o fungicida químico apresentaram efeito significativo sobre a incidência significativa ao longo dos dias, resultados estes representados graficamente pelo teste da regressão (Figura 9).

Observa-se ao compararmos a testemunha com os condimentos que houve um efeito inibitório destes sobre a contaminação fúngica, com exceção da canela. A erva-doce, o tomilho e o orégano foram os condimentos mais eficientes, após os cinco dias de avaliação.

Efeito similar dos tratamentos com óleos essenciais de condimentos foi obtido para o conservante químico, resultado este observado por Amaral & Bara (2005).

Os resultados demonstraram o efeito potencial do tratamento com óleos essenciais visando a prolongar a conservação pós-colheita dos frutos de morango. No entanto, verificou-se que como o cultivo orgânico sofre restrições quanto ao uso de defensivos agrícolas na fase pré-colheita, muitos dos problemas pós-colheita originam-se nesta fase, determinando o insucesso dos tratamentos aplicados no estágio pós colheita.

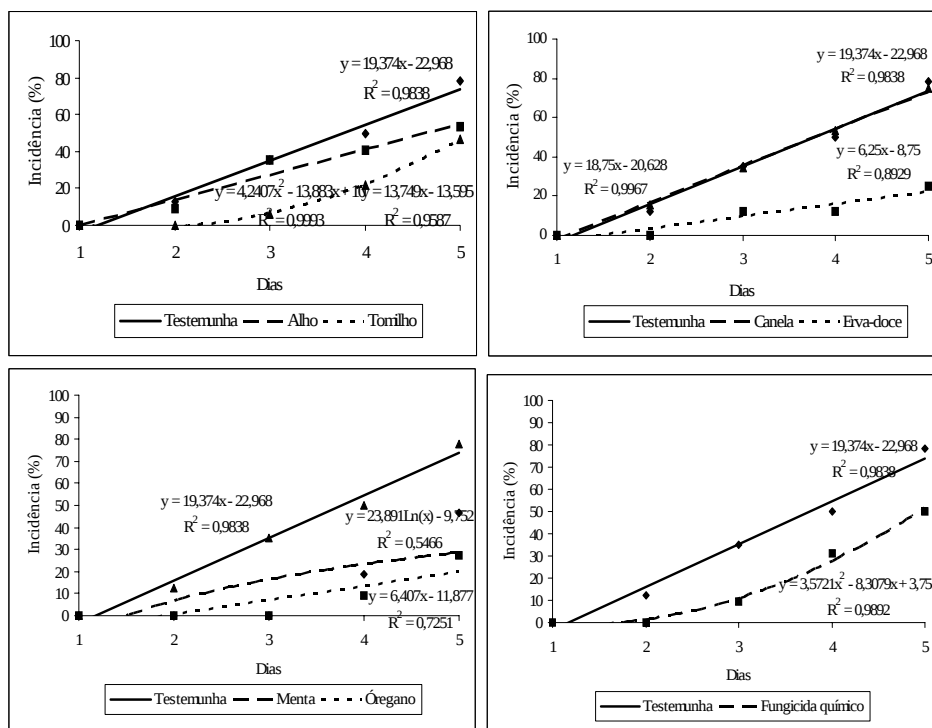


FIGURA 9 Evolução diária da incidência de fungos em frutos de morangos submetidos a tratamentos com óleos essenciais de condimentos. Domingos Martins, ES, 2008.

CONCLUSÕES

- Os testes *in vitro* demonstraram o potencial positivo dos óleos essenciais de condimentos sobre o desenvolvimento micelial e/ou esporulação do fungo *Rhizopus stolonifer* isolado de frutos de morango.
- O efeito da fração volátil dos óleos essenciais de condimentos utilizado no controle de fungos pós-colheita que incide sobre os frutos de morango foi eficaz como medida de conservação dos frutos para o sistema convencional.
- Os óleos essenciais dos condimentos erva-doce, orégano e tomilho, nas concentrações 1500, 2000 e 2000 $\mu\text{g ml}^{-1}$, respectivamente, destacaram-se tanto nos testes *in vitro* quanto *in vivo*.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao professor Luís Roberto Batista pelo apoio na identificação do fungo; a Dra. Deila Magna do Santos Botelho pelo apoio nas análises estatísticas; a FAPEMIG pelo apoio financeiro ao projeto e a CAPES pela bolsa de mestrado concedida nos últimos dois anos; ao INCAPER pelo apoio no desenvolvimento dos testes *in vivo*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, M.F.Z.J.; BARA, M. T. F. Avaliação da atividade antifúngica de extratos de plantas sobre o crescimento de fitopatógenos. **Revista Eletrônica de Farmácia Suplemento**, Goânia, v. 2, n. 2, p. 5- 8, 2005.

ANDREMONT, A. The future control of bacterial resistance to antimicrobial agents. **American Journal of Infect Control**, St. Louis, v. 29, n. 4, p. 256-258, Aug. 2001.

ARAÚJO, R. de C. Z. **Embalagens ativas com ervas aromáticas e condimentares na conservação de pães artesanais**. 2005. 88 p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

BENKEBLIA, N. Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). **Lebensnuttel Wissenschaft nurd Technologie**, San Diego, v. 37, n. 2, p. 263–268, 2004.

BENNIS, S.; CHAMI, F.; CHAMI, N.; BOUCHIKHI, T.; REMMAL. Surface alteration of *Saccharomyces cerevisiae* induced by thymol and eugenol. **Letters in Applied Microbiology**, v. 38, p. 454–458, 2004

CHALFOUN, S. M.; PEREIRA, M. C.; RESENDE, M. L. V.; ANGÉLICO, C. L.; SILVA, R. A. Effect of powdered spice treatments on mycelial growth, sporulation and production of aflatoxins by toxigenic fungi. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 4, p. 856-862, jul./ago. 2004.

DIAS, M. S. C; CANUTO, R. S; SANTOS, L. O.; MARTINS, R. N. Doenças do morango. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 26, n. 228, p. 40-43, 2005.

DIAS, M. S. C; COSTA, H.; CANUTO, R. S. Manejo de doenças do morangueiro. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 28, n.236, p. 64-77, jan./fev. 2007.

ECKERT, J. W.; SIEVERT, J. R.; RATNAYAKE, M. Reduction of imazalil effectiveness against citrus green mold in California packinghouses by resistant biotypes of *Penicillium digitatum*. **Plant Disease**, St. Louis, v. 78, n. 10, p.791–794, Oct. 1994.

FARAG, R. S.; DAW, Z. Y.; ABO-RAYA, S. H. Influence of some spice essencial oils on *Aspergillus parasiticus* growth and production of aflatoxinas in a synthetic medium. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 54, n. 1, p. 54-74, Jan./Feb. 1989.

FERREIRA, D.F. Análise estatística por meio do Sisvar para Windows versão 4.0 In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 255-258.

FORTES, J. F.; COUTO, M. E. Doenças fúngicas e bacterianas. In: FORTES, J. F.; OSÓRIO, V. A. (Ed.). **Morango: fitossanidade**, Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. p.11-18. (Frutas do Brasil, 41).

HITOKOTO, H.; MOROZUMI, S.; WAUKE, T.; SAKAI, S.; KURATA, H. Inhibitory effects of spices on growth and toxin production of toxigenic fungi.

Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 39, n. 4, p. 818-822, Apr. 1980.

KADER, A. (Ed.). **Postharvest Technology of Horticultural Crops**. 3 ed. Riverside: UC Regents, 2002. 535 p.

KOKETSU, M.; GONÇALVES, S. L. **Óleos essenciais e sua extração por arraste a vapor**. Rio de Janeiro: EMBRAPA/CTAA, 1991. 24 p. (Documentos, 8).

MAHMOUD, L. E. Antifungal action and antiaflatoxigenic properties of some essential oil constituents. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 19, n. 2, p. 110-114, Aug. 1994.

MOLEYAR, V.; NARASIMHAM, P. Detoxification of essential oil components (citral and menthol) by *Aspergillus niger* and *Rhizopus stolonifer*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 39, n. 3, p. 239 – 246, Mar. 2006.

NAPOLEÃO, B. A. Morango: conquistando novas fronteiras. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 28, n. 236, jan./fev. 2007.

NÚÑEZ, L.; AQUINO, M.; CHIRIFE, J. Antifungal properties of clove oil (*eugenia caryophyllata*) in sugar solution. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 32, p. 123-126, Apr./June 2001.

NYCHAS, G. J. E. Natural antimicrobials from plants. In: GOULD, G. W. **New methods of food preservation**. London: Blackie Academic and Professional, 1995. p. 58–89.

PARRY, J. W. **Spices**: morphology, histology, chemistry. New York: Chemical, 1962. v. 2, 183 p.

PATKAR, K. L.; USHA, C. M.; SHETTY, H. S.; PASTER, N.; LACEY, J.
Effect of spice essential oils on growth and aflatoxin B1 production by
Aspergillus flavus. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 17, n. 2, p. 49-
51, Aug. 1993.

PEREIRA, M. C. **Efeito da Adição de Condimentos no Controle de
Microrganismos, na Conservação de Produtos de Panificação e na Inibição
de Metabólitos produzidos por Fungos associados ao Café**. 2001. 104 p.
Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de
Lavras, Lavras.

PEREIRA, M. C.; VILELA, G. R.; COSTA, L. M. A. S.; SILVA, R. F.;
FERNANDES, A. F.; FONSECA, E. W. S.; PICCOLI, R. H. Inibição do
desenvolvimento fúngico através da utilização de óleos essenciais de
condimento. **Ciência e agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 4, p. 731-738, jul./ago.
2006.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. 2. ed. London:
Blackie Academic and Professional, 1997. 593 p.
REDDY, B. M.V.; ANGERS, P.; GOSSELING, A.; ARUL, J. Characterization
and use of essential oil from *Thymus vulgaris* against *Botrytis cinerea* and
Rhizopus stolonifer in strawberry fruits. **Phytochemistry**, Oxford, v. 47, n. 8, p.
1515-1520, Aug. 1998.

SAHIN, F.; GULLUCE, M.; DAFERERA, D.; SOKMEN, A.; SOKMEN, M.;
POLISSIOU, M.; AGAR, G.; OZER, H. Biological activities of the essential oils

and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey, **Food Control**, v. 56, p. 2-9, 2003.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A. L. M.; DELARMELINA, C.; FIGUEIRA, G. M.; DUARTE, M. C. T.; REHDER, V. L. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 35, p. 275-280, Oct./Dec. 2004.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F., STANGARLIN, J. R., CRUZ, M. E. S. Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos. **Floresta**, Curitiba, v. 30, n. 3, p. 129-137, Sept. 2000.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Washington, v. 30, n. 3, p. 507-512, Sept. 1974.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; MELLO, J. C. P.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2. ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS /UFSC, 2000. p. 387-416.

SKANDAMIS, P.; KOUTSOUMANIS, K.; FASSEAS, K.; NYCHAS, G. J. E. Inhibition of oregano essential oil and EDTA on *E.coli* 0157:H7. **Italian Journal of Food Science**, Penirola, v. 13, n. 1, p. 55-65, 2001.

TEUBER, M. Spread of antibiotic resistance with food-borne pathogens. **Cellular and Molecular Life Science**, Basel, v. 56, n. 9/10, p. 755-763, Nov. 1999.

VIEGAS, E. C.; SOARES, A.; CARMO, M. G. F.; ROSSETTO, C. A.V.

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, outubro 2005.

ZAICA, L. L. Spices and Herbs: Their antimicrobial activity and its

determinacion. **Journal of Food Safety**, Trumbull, v. 9, n. 2, p. 97-118, 1988.

CAPITULO 2

Efeito *in vitro* e *in vivo* de óleos essenciais de condimentos sobre o desenvolvimento de *Colletotrichum gloesporioides* em frutos de mamão (*Carica papaya* L.)

**EFEITO *IN VITRO* E *IN VIVO* DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE
CONDIMENTOS SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE
COLLETOTRICHUM GLOESPORIODES EM FRUTOS DE MAMÃO
(*CARICA PAPAYA L.*)**

(Efeito dos óleos essenciais sobre fungos)

(Preparado de acordo com as normas da revista “Ciência e Tecnologia de Alimentos”)

Fernanda C. da SILVA¹; Sara M. CHALFOUN^{2*}; Hércio COSTA³; Deila Magna dos Santos BOTELHO⁴; Pedro Paulo Reis REBELLES⁵; Marcelo Cláudio PEREIRA⁶

¹ Economista Doméstica, mestranda em Microbiologia Agrícola/DBI, EPAMIG, Universidade Federal de Lavras, caixa postal 176, cep. 37200-000, Lavras, MG, Brasil. fernandachaves21@yahoo.com.br

^{2*} Doutora em Fitotecnia, EPAMIG, Universidade Federal de Lavras, caixa postal 176, cep. 37200-000, Lavras, MG, Brasil. chalfoun@ufla.br

³ Doutor em Fitopatologia, INCAPER, Secretaria de Agricultura, Centro Regional Centro Serrano. ROD.BR-262, KM 94. Fazenda do Estado. Cep. 29375-000 Venda Nova do Imigrante, ES, Brasil. helciocosta@incaper.es.gov.br

⁴ Doutora em Fitopatologia, EPAMIG, Universidade Federal de Lavras, caixa postal 176, cep. 37200-000, Lavras, MG, Brasil. deilamagna@hotmail.com

⁵ Biólogo, EPAMIG, Universidade Federal de Lavras, caixa postal 176, cep. 37200-000, Lavras, MG, Brasil. pedropauloreisrebelles@yahoo.com.br

⁶ Mestre em Ciências dos Alimentos, EPAMIG, Universidade Federal de Lavras, caixa postal 176, cep. 37200-000, Lavras, MG, Brasil. marcelo.claudio@posgrad.ufla.br

RESUMO

Conduziu-se este trabalho, com o objetivo de avaliar o efeito de óleos essenciais *in vitro* e *in vivo*, sobre o desenvolvimento de *Colletotrichum gloesporioides*, isolado de frutos de mamão (*Carica papaya* L.). Foram testados *in vitro* os óleos, adicionados sobre o meio de cultura e sob tampa das placas de Petri, de alecrim (*Lantana microphylla*), alho (*Allium sativum*), canela (*Cinnamomum spp.*), erva-doce (*Pimpinella anisum*), manjerição (*Ocimum basillium*), menta (*Mentha piperita*), orégano (*Origanum vulgare*) e tomilho (*Thymus Vulgaris*), nas concentrações 500, 1000, 1500 e 2000 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Para o cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticus*) as concentrações testadas foram 200, 400, 600, 800 $\mu\text{g ml}^{-1}$, além da testemunha e álcool etílico. Nos testes *in vivo*, os óleos essenciais foram selecionados conforme sua eficiência *in vitro*, além do uso do fungicida trifanato metílico, álcool etílico e frutos tratados hidrotermicamente. Observou-se que os óleos essenciais apresentaram maior efeito inibitório sobre o desenvolvimento micelial quando adicionados sobre o meio de cultura e para a esporulação quando adicionados sob a tampa das placas de Petri, destacando-se o óleo essencial de menta na concentração de 1500 $\mu\text{g ml}^{-1}$ nos testes *in vitro* e *in vivo*. Com isto verifica-se que os óleos essenciais exerceram ação antifúngica sobre este patógeno.

TERMOS PARA INDEXAÇÃO: Atividade antimicrobiana, fungos, Conservantes naturais, Segurança Alimentar.

ABSTRACT

Effect *in vitro* and *in vivo* of essential oils over the *Colletotrichum gloeosporioides* development in papaya fruits (*Carica papaya* L.)

It was lead this work, the objective of evaluate the effect of essential oils *in vitro* and *in vivo*, over the development of *Colletotrichum gloeosporioides*, isolated of papaya (*Carica papaya* L.) fruits. It was tested *in vitro* the oils added over the culture means and under the Petri plate's lid, of rosemary (*Lantana microphylla*), garlic (*allium sativum*), cinnamon (*Cinnamomun spp.*), anise (*Pimpinella anisum*), basil (*Ocimum basillium*), mint (*Mentha piperita*), oregano (*Origanum vulgare*) and thyme (*Thymus vulgaris*) in 500, 1000, 1500 and 2000 µg ml⁻¹ concentrations. To the clove (*Caryophyllus aromaticus*) was tested concentrations of 200, 400, 600 and 800 µg ml⁻¹. In the *in vivo* test, the essential oils were selected according to its *in vitro* efficiency, besides the use of the fungicide methyl thiophanate, absolute ethil alcohol and hydrothermic treatment of fruits. It was observed that the essential oils presented greater inhibitory effect over the mycelia development when added over the culture means to the sporulation when added under the Petri plate's lid, highlighting it the mint essential oils in concentration of 1500 µg ml⁻¹ in tests *in vitro* and *in vivo*. With this check it was verifical that the spices's essential oils exercise antifungal action over in the pathogen.

INDEX TERMS: Microbial activity, Fungi, Natural preservatives, Food safety.

INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de frutas, com uma produção que supera os 34 milhões de toneladas e o maior produtor mundial de mamão (Cia & Benato, 2005), sendo cultivado em quase todo território brasileiro, merecendo destaque os Estados da Bahia, Espírito Santo e Ceará, responsáveis por cerca de 90% da produção nacional (IBGE, 2008).

As doenças de plantas são responsáveis por grandes perdas nas culturas, dentre as quais se destacam as doenças pós-colheita em frutífera na ordem de 30% dos produtos comercializados (Tavares, 2004).

O mamão é um fruto que se caracteriza por uma vida pós-colheita relativamente curta, completando o seu amadurecimento em aproximadamente uma semana sob condições ambientais. No entanto, vários fatores de pré e pós-colheita, como patógenos, podem reduzir a sua vida pós-colheita (Costa e Balbino, 2002).

A antracnose do mamão (*Carica papaya L.*), causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. é a principal doença de frutos pós-colheita, sendo considerada doença de elevada importância econômica no Brasil (Serra & Silva, 2004).

Os sintomas da doença caracterizam-se inicialmente por áreas de formato mais ou menos circulares e de coloração escura, surgindo nas frutas manchas circulares de coloração marrom, que aumentam de tamanho e tornam-se deprimidas. Normalmente estas lesões podem coalescer, formando grandes manchas de formato irregular (Piccinin et al., 2005)

O uso de fungicidas é o método mais utilizado para controlar as doenças de plantas. Entretanto, há um grande debate sobre aspectos de segurança dos conservantes químicos desde que são considerados responsáveis por muitos atributos carcinogênicos e teratogênicos bem como, toxicidade residual

(Skandamis et al., 2001). Eckert et al. (1994), relata a inabilidade do controle de doenças fúngicas por fungicidas sintéticos em consequência da seleção de linhagens de patógenos tolerantes. Por essas razões, a demanda por conservantes naturais e socialmente mais aceitáveis tem sido intensificada (Skandamis, et al., 2001).

Atualmente, uma das alternativas pesquisadas envolve o uso de extratos vegetais, buscando explorar suas propriedades fungitóxicas (Wilson et al., 1997). Plantas aromáticas e condimentares têm sido tradicionalmente utilizadas na medicina, bem como para estender a vida útil dos alimentos, mostrando inibição contra bactérias, fungos e leveduras. Suas principais propriedades em razão dos óleos essenciais produzidos pelo metabolismo secundário. (Sartoratto et al., 2004; Caccioni e Guizzardi, 1994; Burt, 2004; Schwan-Estrada et al., 2000).

Compostos fenólicos presentes nos óleos essenciais têm sido reconhecidos por possuírem atividade antimicrobiana e alguns são classificados como substâncias que podem ser usadas para prevenir o crescimento pós-colheita de bactérias nativas e contaminantes. Os compostos fenólicos dos óleos degradam a membrana celular, causando o aumento da permeabilidade e escape de constituintes intracelulares vitais ou deficiência dos sistemas enzimáticos bacterianos (Singh, et al., 2002).

Tendo em vista a propriedade inibitória dos óleos essenciais de plantas sobre o desenvolvimento de patógenos e a importância do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* como agente etiológico de uma das principais doenças do mamão, neste estudo, objetivou-se verificar a atividade antimicrobiana *in vitro* e *in vivo* de alguns óleos essenciais como alecrim (*Lantana microphylla*), alho (*Allium sativum*), canela (*Cinnamomum spp.*), cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticus*), erva-doce (*Pimpinella anisum*), manjerição (*Ocimum basillium*), menta (*Mentha piperita*), orégano (*Origanum*

vulgare) e tomilho (*Thymus Vulgaris*) sobre o desenvolvimento micelial e a esporulação de *Colletotrichum gloeosporioides* em frutos de mamão.

MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Ensaio dos óleos essenciais de alecrim, alho, canela, erva-doce, manjerição, menta, orégano, tomilho sobre o desenvolvimento do fungo *Colletotrichum gloesporioides* *in vitro*.

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório do EcoCentro da EPAMIG, localizado no município de Lavras, Minas Gerais.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com 3 repetições em arranjo no esquema fatorial $(8 \times 4 \times 2) + 2$, sendo oito óleos essenciais de condimentos (alecrim, alho, canela, erva-doce, manjerição, menta, orégano e tomilho), quatro concentrações (500, 1000, 1500, 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e dois métodos de adição dos óleos essenciais de condimentos (disco de papel de filtro contendo óleo essencial de condimento adicionado sobre o meio de cultura e sob a tampa da placa de Petri) mais dois tratamentos adicionais, a testemunha e o álcool etílico.

Os óleos essenciais de condimentos foram extraídos através da hidrodestilação (Simões & Spitzer, 2000) e diluídos em álcool etílico.

Como cultura de teste foi utilizada o fungo *Colletotrichum gloesporioides* isolado de frutos de mamão, adquiridos no comércio local de Lavras, MG, purificados e identificados de acordo com Pitt & Hocking (1991).

O método utilizado foi o bioanalítico (Zaika, 1988), *in vitro*, observando o desenvolvimento ou inibição do fungo em diferentes concentrações dos óleos essenciais, usando o meio de cultura BDA (Batata-Dextrose Agar) adicionado de cloranfenicol, apropriado para o desenvolvimento do fungo. Ao meio de cultura autoclavado por 20 minutos a 120°C, após o resfriamento, foi adicionado o inóculo fúngico diluído para a concentração de $6,4 \times 10^4 \text{ cél/cm}^3$ de esporos,

obtido pelo método de filtração da massa fúngica por meio de gaze em água destilada.

Posteriormente, o meio contendo o fungo foi vertido em placas de Petri com 9 cm de diâmetro. Após solidificação, discos de papel de filtro de 5 mm de diâmetro embebidos com 25 µl de óleos essenciais de alecrim (*Lantana microphylla*), alho (*Allium sativum*), canela (*Cinnamomum spp.*), erva-doce (*Pimpinella anisum*), manjeriço (*Ocimum basilicum*), menta (*Mentha piperita*), orégano (*Origanum vulgare*) e tomilho (*Thymus Vulgaris*), nas concentrações 500, 1000, 1500 e 2000 µg ml⁻¹ foram colocados sobre o meio de cultura e sob a tampa da placa de Petri. Placas com meio de cultura sem adição de óleos essenciais e discos de papel de filtro com álcool adicionados sobre o meio de cultura foram utilizados como controle para certificar-se dos efeitos inibitórios dos óleos essenciais. Todos os procedimentos foram realizados sob condições assépticas (capela de fluxo laminar mod. FL7752).

As placas foram vedadas hermeticamente e incubadas em câmara de crescimento – BOD (mod. 347CDG), com temperatura de 25°C, fotoperíodo de 12 horas, durante sete dias.

Após o sétimo dia de incubação, avaliou-se o desenvolvimento micelial e a esporulação.

Para o desenvolvimento micelial adotou-se uma escala de notas, a saber: 0 (ausente); 1 (baixo); 2 (médio); 3 (alto). Para a contagem do número de esporos foi utilizada a Câmara de Newbauer.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as variáveis quantitativas significativas no teste F foram submetidas à análise de regressão e as qualitativas ao teste de médias, comparadas pelo teste de Scott e Knott (1974). Os dados foram analisados pelo programa estatístico, Sistema de Análise de Variância para Dados Balanceados - Sisvar, segundo Ferreira (2000).

2.2 Ensaio do óleo essencial de cravo-da-índia sobre o desenvolvimento do fungo *Colletotrichum gloesporioides* *in vitro*.

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório do EcoCentro da EPAMIG, localizado no município de Lavras, Minas Gerais.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com três repetições e seis tratamentos, sendo quatro concentrações (200, 400, 600, 800 $\mu\text{g ml}^{-1}$), a testemunha e o álcool como controle negativo.

A eficácia das diferentes concentrações do óleo essencial de cravo-da-índia foi avaliada por contraste com álcool e testemunha nos dois métodos estudados de adição do óleo (disco de papel de filtro contendo óleo essencial do condimento adicionado sobre o meio de cultura e sob a tampa da placa de Petri).

As etapas extração do óleo essencial, isolamento e identificação do fungo, procedimentos de instalação e avaliação do ensaio foram realizadas conforme descrito no item 2.1.

2.3 Ensaio dos óleos essenciais de condimentos sobre o desenvolvimento do fungo *Colletotrichum gloesporioides* *in vivo*.

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Fitopatologia do Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural - INCAPER-CRDR-CS, localizado em Domingos Martins, ES.

O delineamento experimental utilizado para o teste *in vivo* foi inteiramente casualizado com três repetições e dez tratamentos (alecrim, alho, canela, manjerição, menta, tomilho, fungicida químico, tratamento hidrotérmico, álcool etílico, testemunha).

A cultivar *Golden* em cultivo convencional, coletada no campo de produção da empresa Gaia, no município de Linhares, no estado do Espírito Santo, foi selecionada para o estudo.

Os frutos sadios foram colhidos em caixas plásticas brancas e limpas, transportados ao Laboratório, onde foram selecionados e distribuídos em bandejas de isopor, com um fruto por bandeja. A cada bandeja foram adicionados os óleos essenciais de alecrim ($1500 \mu\text{g ml}^{-1}$), alho ($2000 \mu\text{g ml}^{-1}$), canela ($2000 \mu\text{g ml}^{-1}$), menta ($1500 \mu\text{g ml}^{-1}$), manjerição ($2000 \mu\text{g ml}^{-1}$) e tomilho ($1000 \mu\text{g ml}^{-1}$), selecionados previamente pela sua eficácia *in vitro*, o fungicida (tiofanato metílico), frutos com tratamento hidrotérmico ($48^{\circ}\text{-}49^{\circ}/20$ minutos) e álcool etílico puro no volume de $2000 \mu\text{l}$ em chumaços de algodão colocados em tampas plásticas previamente esterilizadas. Bandejas sem adição de óleos essenciais foram utilizadas como testemunha.

As bandejas foram embaladas com filme plástico PVC e armazenadas sobre bancadas previamente higienizadas com álcool 70%.

A avaliação da severidade (% área lesionada/fruto) da doença foi realizada a cada dois dias, durante dez dias, totalizando cinco avaliações.

Os dados foram analisados pelo programa estatístico, Sistema de Análise de Variância para Dados Balanceados - Sisvar, segundo Ferreira (2000) e as variáveis significativas no teste F foram submetidas ao teste de regressão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Efeito inibitório de óleos essenciais de alecrim, alho, canela, erva-doce, manjerição, menta, orégano e tomilho sobre o desenvolvimento micelial e esporulação do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* *in vitro*

As variáveis desenvolvimento micelial e esporulação do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* apresentaram interação significativa entre óleos essenciais, concentrações e método de adição dos óleos essenciais indicando dependência entre esses fatores.

O contraste entre a média da testemunha e do álcool e os demais tratamentos apresentou diferença significativa, tanto para o desenvolvimento micelial quanto para a esporulação, indicando que os tratamentos estudados exerceram influência positiva sobre o desenvolvimento do fungo.

Para o desenvolvimento micelial, observou-se que os óleos essenciais de erva-doce, manjerição, menta apresentaram melhores resultados inibitórios quando o mesmo foi adicionado sobre o meio de cultura, nas concentrações 500, 1000 e 1500 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Na concentração de 2000 $\mu\text{g ml}^{-1}$ observou-se que o óleo essencial de canela reduziu totalmente o desenvolvimento micelial do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Tabela 1). Resultado semelhante foi verificado por Wang et al., (2005) em que o óleo essencial de canela inibiu totalmente o desenvolvimento de *Coriolus versicolor*, *Lenzites betulina*, *Pycnoporus coccineus*, *Trichaptum abietinum*, *Oligoporus lowe*, *Laetiporus sulphureus*, *Antrrodia taxa*, *Fomitopsis pinicola* e *Phaeolus schweinitzii*, a partir da concentração de 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$.

Por outro lado, verificou-se que os óleos essenciais de condimentos quando adicionados sob a tampa da placa de Petri, testados nas concentrações

500, 1000, 1500 e 2000 $\mu\text{g ml}^{-1}$, apresentaram oscilações quanto ao efeito inibitório (Tabela 1).

De uma forma geral, os óleos essenciais apresentaram maior redução da esporulação do fungo quando adicionados sobre o meio de cultura.

TABELA 1 Valores médios de notas do Desenvolvimento micelial do fungo *Rhizopus stolonifer*, isolado de morango, submetidos a diferentes óleos essenciais de condimentos, concentrações e dois métodos de adição do óleo (adicionado sobre o meio de cultura e sob a tampa da placa de Petri). *

ÓLEOS ESSENCIAIS	CONCENTRAÇÕES ($\mu\text{g ml}^{-1}$)							
	500		1000		1500		2000	
	Métodos de Adição		Métodos de Adição		Métodos de Adição		Métodos de Adição	
	Meio	Tampa	Meio	Tampa	Meio	Tampa	Meio	Tampa
Alecrim	2,33Ab	2,00Aa	2,66Ac	2,00Aa	3,00Bb	2,00Ab	3,00Bd	1,66Ab
Alho	2,00Ab	3,00Bb	2,00Ab	3,00Bb	2,00Aa	3,00Bc	2,00Ac	2,00Ab
Canela	3,00Bc	2,00Aa	3,00Bc	2,00Aa	1,66Aa	2,00Bb	0,00Aa	1,00Ba
Erva-doce	0,66Aa	3,00Bb	1,00Aa	2,33Ba	1,66Aa	3,00Bc	2,33Ac	3,00Ad
Manjeriço	1,00Aa	3,00Bb	1,00Aa	2,00Ba	1,33Aa	2,00Ab	1,00Ab	2,00Bb
Menta	1,00Aa	1,66Aa	1,00Aa	1,66Aa	1,00Aa	1,00Aa	1,33Ab	2,33Bc
Orégano	1,00Aa	3,00Bb	2,00Ab	2,66Bb	1,33Aa	3,00Bc	1,66Ac	3,00Bd
Tomilho	2,33Ab	2,00Aa	2,00Ab	2,33Aa	1,66Aa	2,00Ab	2,00Ac	2,00Ab

* Médias seguidas pelas mesmas letras, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas dentro da mesma concentração, não diferem estatisticamente pelo teste Scott Knott, a 5% de probabilidade. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Para a esporulação do fungo *Colletotrichum gloesporioides*, a erva-doce apresentou melhores resultados inibitórios quando foi adicionada sobre o meio de cultura, nas concentrações 500, 1000 e 1500 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Para os óleos essenciais de manjerição, menta e tomilho nas concentrações 1000, 1000 e 1500, respectivamente, observou-se o mesmo comportamento (Tabela 2). Resultados semelhantes foram relatados por Pereira (2006), para o desenvolvimento micelial de *Aspergillus niger* e *Aspergillus flavus*.

Vale ressaltar, que o óleo essencial de canela inibiu totalmente a esporulação do *C. gloesporioides* na concentração de 2000 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (Tabela 2). Estudo realizado por Ranasinghe et al., (2002), verificou o efeito inibitório do óleo essencial de canela sobre o desenvolvimento *Lasiodiplodia theobromae*, *Colletotrichum musae* e *Fusarium proliferatum*, patógenos causadores de doenças em frutos de banana.

Já o óleo essencial de tomilho nas concentrações de 1000 e 2000 $\mu\text{g ml}^{-1}$ apresentou maior efeito inibitório quando adicionado sob a tampa da placa de Petri, contudo na concentração de 1500 $\mu\text{g ml}^{-1}$ verificou-se este mesmo efeito inibitório da esporulação quando o óleo essencial foi adicionado sobre o meio de cultura. (Tabela 2). Efeito antifúngico semelhante foi relatado por Reddy (1998) que considerou o óleo essencial de tomilho um potencial volátil como conservante antifúngico para frutos de morango no que se refere aos patógenos *Botrytis cinerea* e *Rhizopus stolonifer*.

O mesmo efeito inibitório foi observado para os óleos essenciais de alho e tomilho nas concentrações de 1000 e 2000 $\mu\text{g ml}^{-1}$ quando adicionados sob a tampa da placa da Petri.

Para os demais óleos essenciais verificou-se que o seu efeito inibitório sobre o fungo oscilou conforme os diferentes métodos de adição dos óleos empregados, bem como as concentrações testadas.

De uma forma geral, os óleos essenciais apresentaram maior redução da esporulação do fungo quando adicionados sob a tampa da placa de Petri.

TABELA 2 Valores médios do número de esporos (cel/cm³) do fungo *Rhizopus stolonifer*, isolado de morango, submetidos a diferentes óleos essenciais de condimentos, concentrações e dois métodos de adição do óleo (adicionado sobre o meio de cultura e sob a tampa da placa de Petri). *

ÓLEOS ESSENCIAIS	CONCENTRAÇÕES (µg ml ⁻¹)							
	500		1000		1500		2000	
	Meio	Tampa	Meio	Tampa	Meio	Tampa	Meio	Tampa
Alecrim	18,85Ac	18,86Ae	23,42Ab	22,57Ac	20,69Bc	4,05Ab	24,94Bf	14,65Ab
Alho	26,50Bd	12,25Ac	28,56Bc	7,90Aa	24,17Bc	13,68Ac	22,09Be	5,89Aa
Canela	35,38Be	6,16Ab	22,92Bb	3,29Aa	13,78Ab	11,48Ac	0,00Aa	7,36Ba
Erva-doce	3,09Aa	14,49Bd	6,22Aa	7,81Aa	4,02Aa	11,78Bc	27,04Bf	15,36Ab
Manjerição	10,04Ab	31,77Bf	5,64Aa	13,42Bb	11,95Ab	12,01Ac	4,26Ab	4,79Aa
Menta	11,68Bb	0,00Aa	5,48Aa	36,39Bb	9,02Ba	0,08Aa	13,26Ac	35,46Bc
Orégano	21,76Ac	19,34Ae	20,48Bb	10,26Ab	13,40Ab	18,08Bd	32,81Bg	12,20Ab
Tomilho	19,74Bc	5,21Ab	26,74Bc	5,06Aa	6,50Aa	5,02Ab	17,32Bd	5,28Aa

* Médias seguidas pelas mesmas letras, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas dentro da mesma concentração, não diferem estatisticamente pelo teste Scott Knott, a 5% de probabilidade. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Verificou-se, portanto, que os efeitos dos óleos essenciais sobre o desenvolvimento micelial e esporulação diferiram quando foram adicionados ao disco de papel de filtro e estes colocados em contato com o meio de cultura e sob a tampa das placas de Petri. Resultado semelhante foi observado por Vilela (2007) que avaliou o método de adição do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* sobre espécies produtoras de aflatoxinas e verificou que o método de adição do óleo sob a tampa da placa de Petri foi mais eficaz do que adicionado sobre o meio de cultura.

Zaika (1988) relata que o método denominado, “Zona de inibição”, utilizado neste estudo tem a limitação de que seu efeito inibitório depende da habilidade de difusão do óleo essencial pelo meio agar. Estudo realizado por Moleyar. e Narasimham, (2006), mostra a capacidade de detoxificação dos componentes dos óleos essenciais (mentol e citral) por *Aspergillus niger* e *Rhizopus stolonifer*, e tal comportamento pode se estender aos outros microrganismos.

A interação entre as concentrações testadas, os óleos essenciais e métodos de adição dos óleos essenciais estudados foi demonstrada pelas análises de regressão, cujos resultados encontram-se representados no presente trabalho.

Observa-se nas Figuras 1 e 2, para o efeito dos óleos essenciais de condimentos adicionados sobre o meio de cultura com o fungo que os condimentos canela, erva-doce e orégano, apresentaram índices de inibição variáveis de acordo com as concentrações testadas.

Com relação ao desenvolvimento micelial observou-se que o óleo essencial de canela reduziu esta variável a partir da concentração de 525 $\mu\text{g ml}^{-1}$ até a concentração final testada. Já o condimento erva-doce apresentou um aumento do desenvolvimento micelial do fungo proporcional ao aumento das concentrações (Figura 1).

Para a esporulação, verificou-se que os óleos essenciais de alho e canela apresentaram uma redução linear, proporcional ao aumento das concentrações testadas. Resultados semelhantes foram observados por Benkeblia (2004), que verificou a susceptibilidade dos fungos *Aspergillus niger*, *Penicillium cyclopium* e *Fusarium oxysporum* frente ao óleo essencial de alho utilizado nas concentrações de 50, 100, 200, 300 e 500 ml/l (Figura 2).

Já os óleos essenciais de erva-doce, menta e orégano apresentaram um ótimo índice de inibição até a concentração de 895, 1220 e 1162 $\mu\text{g ml}^{-1}$, respectivamente, verificando-se um aumento da esporulação com o aumento da concentração (Figura 2).

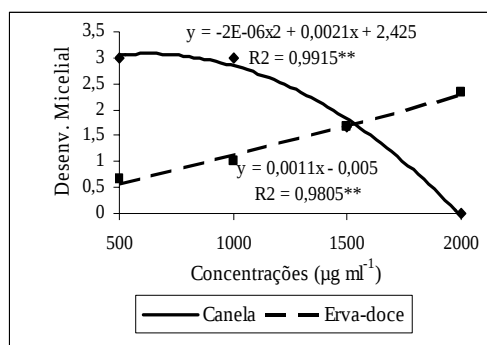


FIGURA 1 Efeito das concentrações dos óleos essenciais de canela e erva-doce quando adicionados sobre o meio de cultura com o fungo no desenvolvimento micelial do fungo *Colletotrichum gloesporioides*. Lavras, MG, 2008.

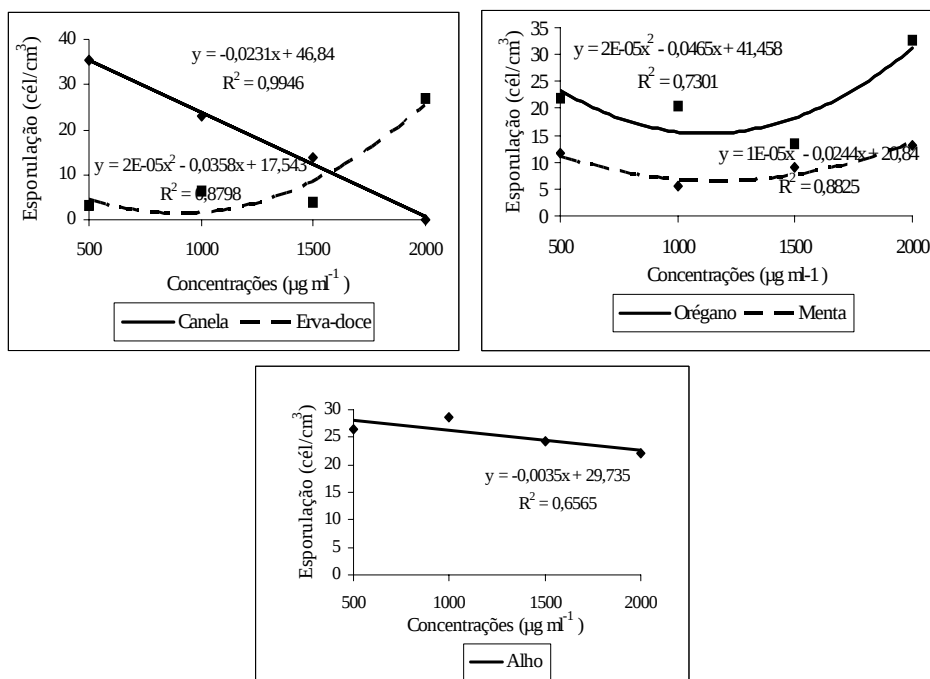


FIGURA 2 Efeito das concentrações dos óleos essenciais de canela, erva-doce, menta, orégano e alho quando adicionados sobre o meio de cultura com o fungo na esporulação do fungo *Colletotrichum gloesporioides*. Lavras, MG, 2008.

Para o efeito do óleo essencial de condimento adicionado sob a tampa das placas de Petri, verificou-se que o alho, canela, manjerição e menta apresentaram efeito inibitório significativo sobre o desenvolvimento micelial e os óleos essenciais de manjerição e erva-doce sobre a esporulação do fungo, respectivamente (Figuras 3 e 4).

Os óleos essenciais de canela e alho apresentaram efeito inibitório do desenvolvimento micelial de *C. gloesporioides* a partir da concentração de 950 µg ml⁻¹ até a concentração final testada. Para o manjerição e a menta observaram-se comportamentos equivalentes, sendo que a inibição do crescimento micelial ocorreu no intervalo de 500 a 1550 µg ml⁻¹, verificando-se

a partir dessa concentração um aumento (Figura 3). Resultados semelhantes foram obtidos por Sartoratto et. al., (2004), ao verificarem a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de condimentos, dentre esses, os óleos essenciais de manjerição e menta sobre espécies bacterianas patogênicas de alimentos e a levedura *Candida albicans*.

Para a esporulação, verificou-se que o óleo essencial de manjerição teve efeito inibitório proporcional ao aumento das concentrações. Já o condimento erva-doce apresentou redução da esporulação até a concentração de 1215 $\mu\text{g ml}^{-1}$, sendo observado após esta dose um aumento da esporulação do fungo (Figura 4).

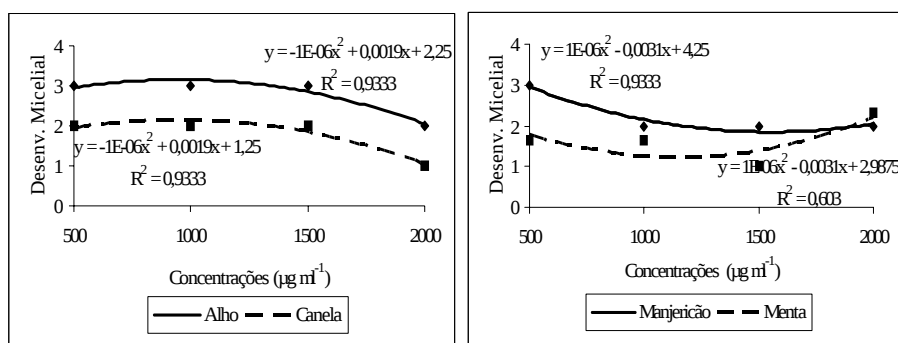


FIGURA 3 Efeito das concentrações dos óleos essenciais de alho, canela, manjerição e menta quando adicionados sob a tampa da placa de Petri com o fungo no desenvolvimento micelial do fungo *Colletotrichum gloesporioides*. Lavras, MG, 2008.

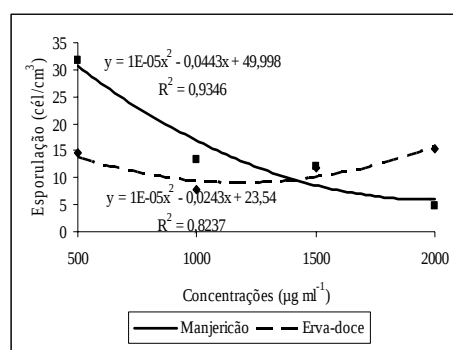


FIGURA 4 Efeito das concentrações dos óleos essenciais de erva-doce e manjerição quando adicionados sob a tampa da placa de Petri com o fungo na esporulação do fungo *Colletotrichum gloesporioides*. Lavras, MG, 2008.

3.2 Ensaio do óleo essencial de cravo-da-índia sobre o desenvolvimento do fungo *Colletotrichum gloesporioides* sob condições *in vitro*.

O óleo essencial de cravo-da-índia, conforme vários relatos da literatura (Araújo 2005; Moreira et al., 2005; Pereira 2006; Pawar & Thaker, 2006), apresenta grande eficiência como um agente antimicrobiano, o que justifica o uso de concentrações inferiores aos demais e seu estudo separadamente.

Os resultados para o desenvolvimento micelial nos tratamentos com óleo essencial obtido do cravo-da-índia, álcool e testemunha, demonstrados pelo contraste de médias quando o disco de papel filtro foi adicionado ao meio de cultura com o fungo e sob tampa da placa de Petri estão apresentados nas Figuras 5, 6, 7 e 8, respectivamente.

Nas figuras 5 e 6, verificou-se que as diferentes concentrações do óleo de cravo-da-índia testadas não foram efetivas na redução do desenvolvimento micelial, apresentando valores significativamente maiores quando comparados à testemunha e ao controle negativo. Provavelmente as concentrações testadas

foram ineficientes para inibir o desenvolvimento micelial do fungo *Colletotrichum gloesporioides*.

Para a esporulação verifica-se que o condimento cravo-da-índia inibiu significativamente ao ser comparado à testemunha e ao álcool nas concentrações de 400 e 600 $\mu\text{g ml}^{-1}$, não apresentando o mesmo efeito para as outras concentrações testadas.

O álcool apesar de ser um agente antimicrobiano não mostrou efeito inibitório significativo ao ser comparado à testemunha.

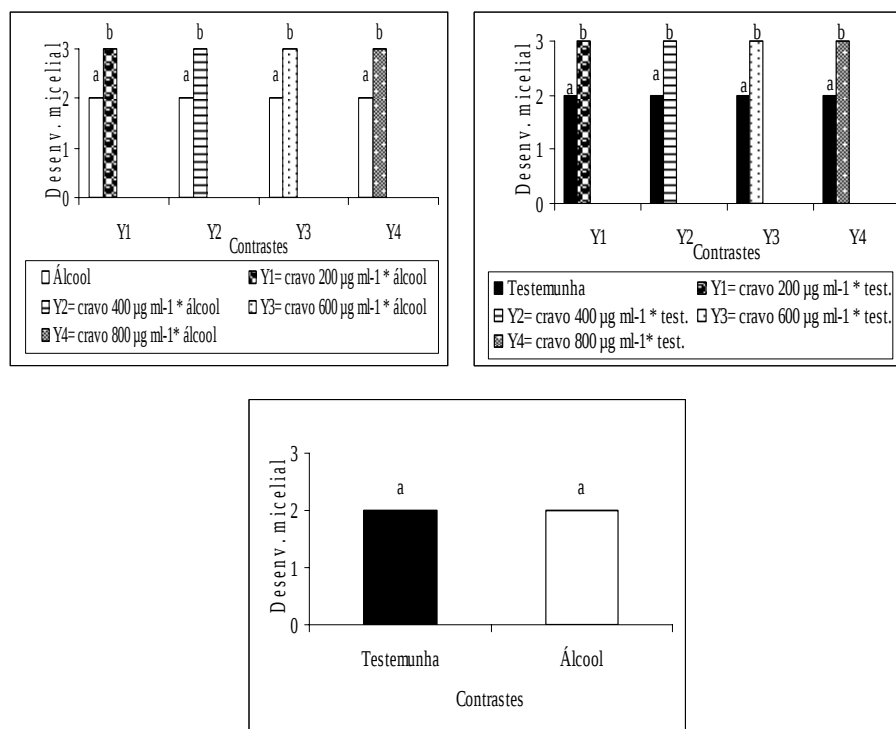


FIGURA 5 Contraste das médias de controle do fungo *Colletotrichum gloesporioides* expresso em média geral do desenvolvimento micelial quando submetidos aos tratamentos com óleo essencial de cravo-da-índia adicionado sobre o meio de cultura com o fungo. UFLA, Lavras, MG, 2008.

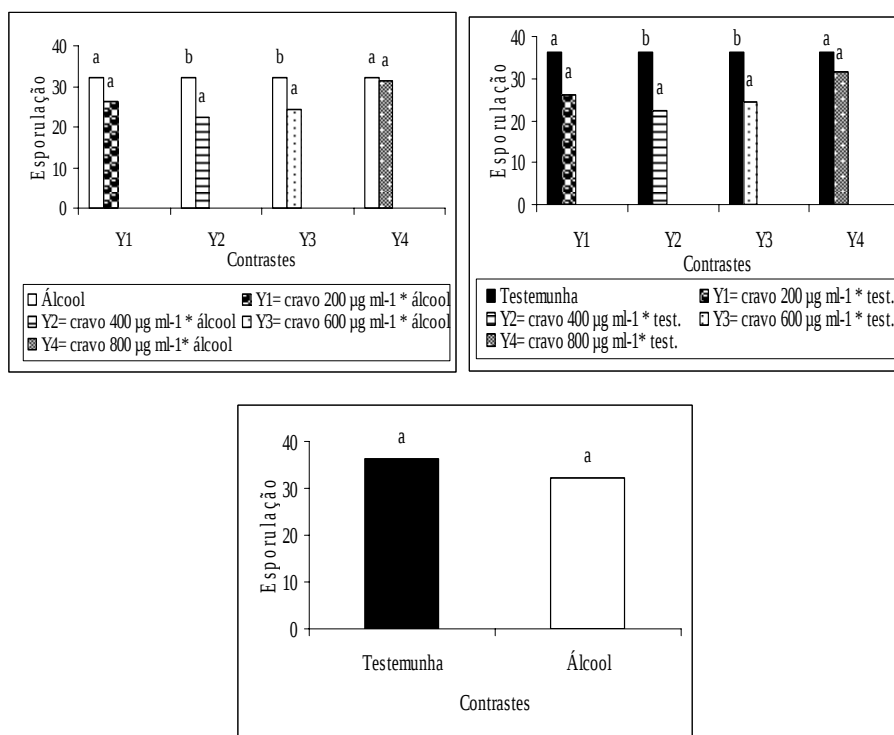


FIGURA 6 Contraste das médias de controle do fungo *Colletotrichum gloesporioides* expresso em média geral de esporos quando submetidos ao tratamento com óleo essencial de cravo-da-índia adicionado sobre o meio de cultura com o fungo. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Na Figura 7, observa-se que para o desenvolvimento micelial, o óleo de cravo-da-índia apresentou resultado equivalente ao da testemunha e ao controle negativo (álcool etílico), concordante com resultados semelhantes obtidos por Araújo (2005). Ao compararmos o álcool e a testemunha observou-se o mesmo resultado obtido para o desenvolvimento micelial quando o óleo foi adicionado em contato com o meio de cultura.

Para a esporulação do fungo *C. gloesporioides*, o óleo essencial do condimento cravo-da-índia apresentou efeito significativo em relação ao controle negativo (álcool etílico puro), observando-se maior índice de esporulação na concentração de 800 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Já ao compararmos a testemunha, verifica-se que o óleo essencial de cravo-da-índia teve efeito significativo na redução da esporulação do fungo nas concentrações de 200, 400 e 600 $\mu\text{g ml}^{-1}$.

Ao compararmos a testemunha e o álcool etílico puro para a esporulação verifica-se que o álcool apresentou efeitos antifúngicos.

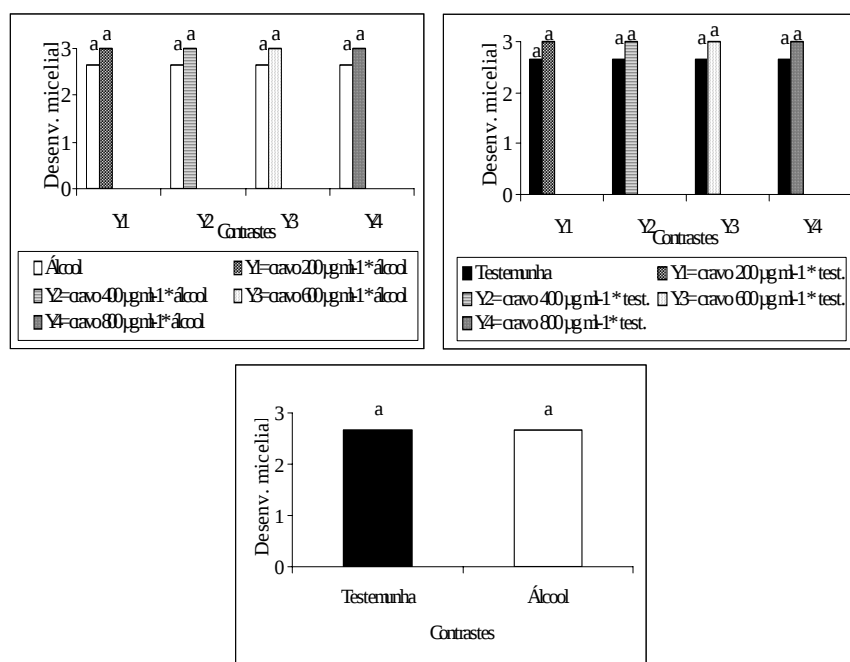


FIGURA 7 Contraste das médias de controle do fungo *Colletotrichum gloesporioides* expresso em média geral do desenvolvimento micelial quando submetidos ao tratamento com óleo essencial de cravo-da-índia adicionado sob a tampa das placas de Petri. UFLA, Lavras, MG, 2008.

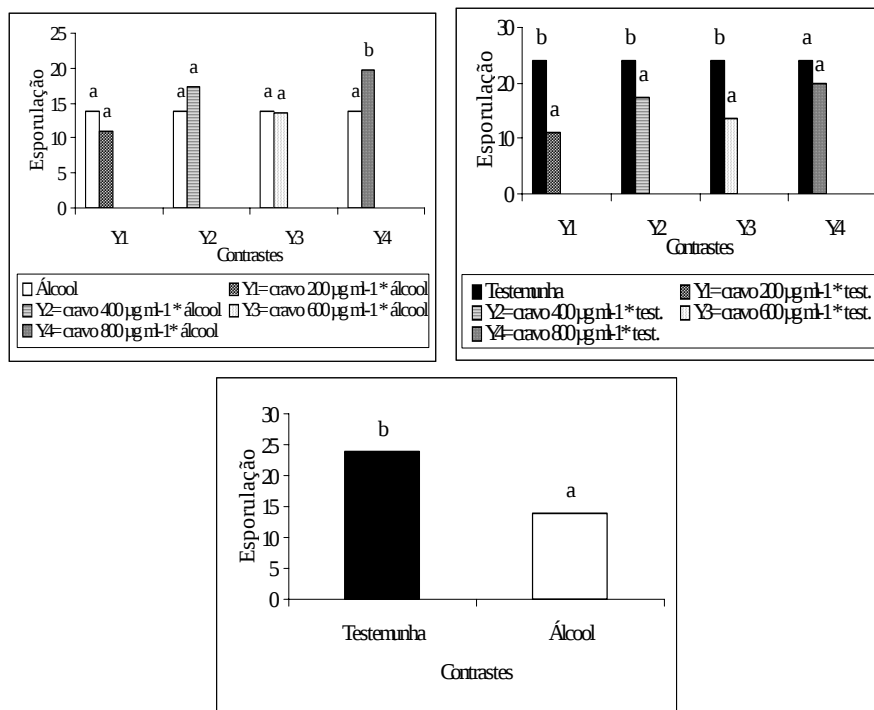


FIGURA 8 Contraste das médias de controle do fungo *Colletotrichum gloesporioides* expresso em média geral de esporos quando submetidos ao tratamento com óleo essencial de cravo-da-índia adicionado sob a tampa das placas de Petri. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Apesar dos resultados para o condimento cravo-da-índia não ter sido o esperado verifica-se que o óleo essencial desse condimento representa um grande potencial como conservante natural, visto que seu principal componente químico é o eugenol, um composto fenólico volátil presente em 90% nas folhas da planta e em 70-85% do óleo essencial (Brown & Morra 1995, Brown et al. 1991). Deve-se considerar ainda que trabalhos mostraram que eugenol ou extratos de *S. aromaticum* apresentam atividade nematocida (Tsao & Yu 2000, Walker & Melin 1996), inseticida (El-Hag et al., 1999), antiviral (Yukawa et al.,

1996), bactericida (Dorman e Deans 2000, Nascimento *et al.* 2000, Ouattara *et al.*, 1997) e fungicida (Delespaul *et al.*, 2000).

3.3 Efeito inibitório de óleos essenciais de condimentos no controle de fungos na fase pós-colheita de frutos de mamão

Os óleos essenciais dos condimentos alecrim, alho, canela, manjerição, menta e tomilho, selecionados com base nos resultados obtidos nos testes *in vitro* do presente estudo, o fungicida químico tiofanato metílico, álcool etílico e mamões sob tratamento hidrotérmico foram testados *in vivo* visando à conservação pós-colheita de frutos de mamão, cultivar *Golden*, obtidos em cultivo convencional, localizados no município Linhares, ES.

Ao compararmos a testemunha com os condimentos verifica-se que houve um efeito inibitório destes sobre a contaminação fúngica, sendo que os condimentos manjerição, menta e tomilho foram mais eficientes.

As concentrações dos condimentos foram selecionadas com base na CMI (Concentração Mínima Inibitória) para o desenvolvimento micelial e esporulação de cada condimento, prevalecendo a menor dose necessária para o controle dos processos.

Observou-se ainda que os óleos essenciais de alecrim, alho, canela, menta, manjerição e tomilho apresentaram severidade crescente ao longo dos dias, resultados estes representados graficamente pelo teste da regressão (Figura 9).

A eficiência relativamente baixa dos tratamentos com óleos essenciais no controle da antracnose do mamão na fase pós-colheita justifica-se uma vez que o fungo agente causal da doença, *Colletotrichum gloeosporioides*, pode infectar os frutos em etapas anteriores do cultivo, instalando-se na camada sub-cuticular, concordante com relatos de Dickman & Alvarez (1983), e pelo efeito fungicida superficial dos óleos essenciais.

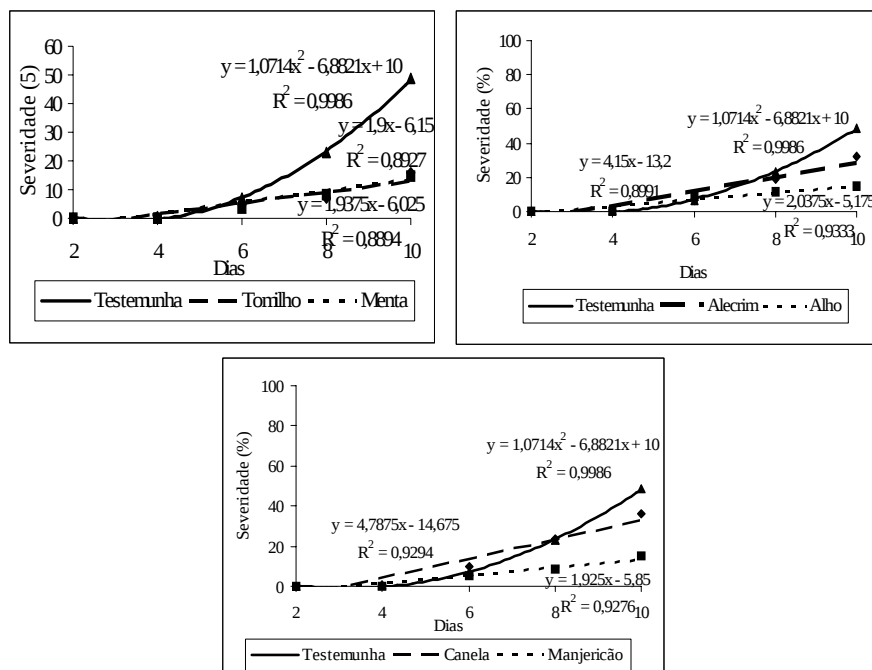


FIGURA 9 Severidade do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* em mamão sob o efeito de óleos essenciais de tomilho, menta, alecrim, alho, canela e manjerição. Domingos Martins, 2008.

Apesar dos frutos testados com o fungicida tiofanato metílico e tratados hidrotérmicamente não apresentarem diferenças significativas em relação a severidade e o número de dias deve-se ressaltar, que os dois tratamentos tiveram elevado efeito inibitório sobre o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* do mamão. Estudo realizado por Tavares & Souza (2005), apresentou resultado contrário ao uso do fungicida tiofanato metílico sobre o controle micelial e germinação de esporos do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* do mamão. Para o tratamento hidrotérmico resultados semelhantes foram encontrados por Lima et al., 2007; Dias et al., 2005).

CONCLUSÕES

- Os testes *in vitro* demonstraram o potencial positivo dos óleos essenciais de condimentos sobre o desenvolvimento micelial do fungo *Colletotrichum gloesporioides* isolado de frutos de morango principalmente, quando adicionados sobre o meio de cultura. Por outro lado, para a esporulação este mesmo comportamento foi verificado, quando os óleos foram adicionados sob a tampa das placas de Petri.
- O efeito da fração volátil dos óleos essenciais de condimentos utilizado no controle de fungos pós-colheita que incide sobre os frutos de mamão foi eficaz como medida de conservação dos frutos para o sistema convencional.
- O óleo essencial de menta, na concentração de 1500 µg ml⁻¹, destacou-se tanto nos testes *in vitro* quanto *in vivo*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAÚJO, R. de C. Z. **Embalagens ativas com ervas aromáticas e condimentares na conservação de pães artesanais**. 2005. 88 p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- BENKEBLIA, N. Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). **Lebensmittel-Wissenschaft und technologie**, San Diego, v. 37, n. 2, p. 263–268, 2004.
- BROWN, P. D.; MORRA, M. J. Glucosinolate-containing plant tissues as bioherbicides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 43, n. 12, p. 3070-3074, Dec. 1995.
- BROWN, P. D.; MORRA, M. J.; MCCAFFREY, J. P.; AULD, D. L.; WILLIAMS III, L. Allelochemicals produced during glucosinolate degradation in soil. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 17, n. 10, p. 2021-2034, Oct. 1991.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. **International Journal Food Microbiology**, Amsterdam, v. 94, n. 3, p.: 223-253, Aug. 2004.
- CACCIONI, D. R. L.; GUIZZARDI, M. Inhibition of germination and growth of fruit and vegetable post-harvest pathogenic fungi by essential oil components, **Journal Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 6, n. 1, p. 173–179, Jan./Fev. 1994.

CIA, P.; BENATO, E. A. Doenças do Mamão. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 26, n. 228, p. 25-29, 2005.

COSTA, A. de F. S. da; BALBINO, J. M. de S. Características da fruta para exportação e normas de qualidade. In: FOLEGATTI, M. I. da S.; MATSUURA, F. C. A. U. **Mamão: pós-colheita**. Brasília: EMBRAPA- Mandioca e Fruticultura, 2002. 59 p. (Frutas do Brasil, 21).

DELESPAUL, Q.; BILLERBECK, V. G.; ROQUES, C. G.; MICHEL, G.; MARQUIER-VINUALES, C.; BESSIERE, J. M. The antifungal activity of essential oils as determined by different screening methods. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 12, n. 2, p. 256-266, Mar. 2000.

DIAS, M. S. C.; CANUTO, R. S.; SANTOS, L. O.; MARTINS, R. N. Doenças do morango. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 26, n. 228, p. 40-43, 2005.

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

DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 88, n. 2, p. 308-316, 2000.

EL-HAG, E.A.; EL-NADI, A. H; ZAITOON, A. A. Toxic and growth retarding effects of three plant extracts on *Culex pipiens* larvae (Diptera: Culicidae). **Phytotherapy Research**, Sussex, v. 13, p.388-392, Aug. 1999.

ECKERT, J. W.; SIEVERT, J. R.; RATNAYAKE, M. Reduction of imazalil effectiveness against citrus green mold in California packinghouses by resistant biotypes of *Penicillium digitatum*. **Plant Disease**, St. Louis, v. 78, n. 10, p.791–794, Oct. 1994.

FERREIRA, D. F. Análise estatística por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000. Disponível em: <<http://www.ibraf.org.br/x-es/f-esta.html>>. Acesso em: 11 jan. 2000.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção agrícola municipal**. Rio de Janeiro: IBGE, 2008. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 14 fev. 2008.

LIMA, A. N.; BATISTA, J. L.; COSTA, N. P.; PEREIRA, W. E.; BRITO, C. H.; SILVA, A. B.; MARINUS, J. V. de M. L.; SOUZA JÚNIOR, S. P. de. Influência do tratamento térmico com água quente no controle de *ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) e na qualidade de frutos de sapoti (*Achras sapota* L.). **Engenharia Ambiental**, Espírito Santo do Pinhal, v. 4, p. 68-79, jul./dez. 2007.

MOLEYAR, V.; NARASIMHAM, P. Detoxification of essential oil components (citral and menthol) by *Aspergillus niger* and *Rhizopus stolonifer*. **Journal of**

the Science of Food and Agriculture, London, v. 39, n. 3 , p. 239 – 246, Mar. 2006.

MOREIRA, M. R.; PONCE, A.G.; DEL VALLE, C. E.; ROURA, S. I. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. **LTW- Food Science and Technology**, Amsterdam, v. 38, n. 5, p. 565-570, 2005.

NASCIMENTO, G .G. F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P. C.; SILVA, G. L. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 31, n. 4, p. 247-256, Oct./Dec. 2000.

OUATTARA, B.; SIMARD, R. E.; HOLLEY, R. A.; PIETTE, G. J. P; BEGIN, A. Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 37, n. 2, p.155-162, July 1997.

PAWAR, V. C.; THAKER, V. S. *In vitro* efficacy of 75 essential oils against *Aspergillus niger*. **Mycoses**, Oxford, v. 49, n. 4, p. 316-323, July 2006

PEREIRA, M. C.; VILELA, G. R.; COSTA, L. M. A. S.; SILVA, R. F.; FERNANDES, A. F.; FONSECA, E. W. S.; PICCOLI, R. H. Inibição do desenvolvimento fúngico através da utilização de óleos essenciais de condimento. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 4, p. 731-738, jul./ago., 2006.

PICCININ, E.; PASCOLATI, S.F.; DI PIERO, R.M. Doenças da goiabeira. In: KIMATI, H.; BERGAMIN FILHO, A.; AMORIN, L.; CAMARGO, L. E. A.;

REZENDE, J. A. M. (Eds.). **Manual de fitopatologia**: doenças das plantas cultivadas. 4 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2, p.401-406.

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

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.

REDDY, B. M.V.; ANGERS, P.; GOSSELING, A.; ARUL, J. Characterization and use of essential oil from *Thymus vulgaris* against *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer* in strawberry fruits. **Phytochemistry**, Oxford, v. 47, n. 8, p. 1515-1520, Aug. 1998.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A. L. M.; DELARMELINA, C.; FIGUEIRA, G. M.; DUARTE, M. C. T.; REHDER, V. L. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 35, n. 4, p. 275-280, Oct./Dec. 2004.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Washington, v. 30, n. 3, p. 507-512, Sept. 1974.

SERRA, I. M. R. de S.; SILVA, G. S. da. Caracterização Morfofisiológica de Isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* Agentes de Antracnose em

Frutíferas no Maranhão. **Summa Phytopathologica**, São Paulo, v. 30, n. 4, p. 475-480, out./dez. 2004.

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

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O.; Schemkel, E. P.; MELLO, J. C. P.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2. ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/ UFSC, 2000. p.387-416.

SINGH, N.; SINGH, R. K.; BHUNIA, A. K.; STROSHINE, R L. Efficacy of chlorine dioxide, ozone an thyme essential oil or a sequential washing in killing *E.coli* 0157:H7 on lettuce and baby carrots. **Lebensmittel – Wissenschaft & Technology**, San diego, v. 35, n. 8, p.720-729, 2002.

SKANDAMIS, P.; KOUTSOUMANIS, K.; FASSEAS, K.; NYCHAS, G. J. E. Inhibition of oregano essential oil and EDTA on *E.coli* 0157:H7. **Italian Journal of Food Science**, Pinerolo, v. 13, n. 1, p. 55-65, 2001.

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

TAVARES, G. M.; SOUZA, P. E. Efeito de fungicidas no controle *in vitro* de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente etiológico da antracnose do mamoeiro

(*Carica Papaya L.*). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 1, p. 52-59, jan./fev. 2005.

TSAO, R.; YU, Q. Nematicidal activity of monoterpenoid compounds against economically important nematodes in agriculture. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 12, n. 3, p. 350-354, May/June 2000.

VILELA, G. R. **Efeito do óleo essencial de Eucalyptus globulus sobre espécies produtoras de aflatoxinas**. 2007. 64 p. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimento) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

ZAICA, L. L. Spices and Herbs: Their antimicrobial activity and its determinacion. **Journal of Food Safety**, Trumbrull, v. 9, n. 2, p. 97-118, 1988.

WALKER, J. T.; MELIN, J. B. *Mentha x piperita*, *Mentha spicata* and effects of their essential oils on Meloidogyne in soil. *Journal of Nematology*, Lakeland, v. 28, n. 4, p. 629-635, Dec. 1996. Supplement.

WANG, S - Y; CHEN, P - F, CHANG, S - T. Antifungal activities of essential oils and their constituents from indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*) leaves against wood decay fungi. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 96, n. 7, p. 813–818, May 2005.

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

YUKAWA, T. A.; KUROKAWA, M.; SATO, H.; YOSHIDA, Y.;
KAGEYAMA, S.; HASEGAWA, T.; NAMBA, T.; IMAKITA, M.; HOZUMI,
T.; SHIRAKI, K. Prophylactic treatment of cytomegalovirus infection with
traditional herbs. **Antiviral Research**, Amsterdam, v. 32, n. 2, p. 63-70, Oct.
1996.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao professor Luís Roberto Batista pelo apoio na identificação do fungo; a Dra. Deila Magna dos Santos Botelho pelo apoio nas análises estatísticas; a FAPEMIG pelo apoio financeiro ao projeto e a CAPES pela bolsa de mestrado concedida nos últimos dois anos; ao INCAPER pelo apoio nos teste *in vivo*.