

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS DE CURITIBANOS
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
José Luis França Pinto Raduan

**MÉTODOS DE CONTROLE DE *Colletotrichum* spp. EM *Acca sellowiana*
(Berg) Burret: AVALIAÇÃO *in vitro* E EM FRAGMENTOS DE FRUTOS
PÓS-COLHEITA**

Curitibanos
2017

José Luis França Pinto Raduan

**MÉTODOS DE CONTROLE DE *Colletotrichum* spp. EM *Acca sellowiana*
(Berg) Burret: AVALIAÇÃO *in vitro* E EM FRAGMENTOS DE FRUTOS
PÓS-COLHEITA**

Trabalho Conclusão do Curso de Graduação em
Agronomia do Centro de Ciências Rurais da
Universidade Federal de Santa Catarina como
requisito para a obtenção do Título de Bacharel em
Agronomia

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Terumi Itako

Curitibanos

2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Raduan, José Luis França Pinto
Métodos de controle de *Colletotrichum* spp. em *Acca
sellowiana* (Berg) Burret : avaliação in vitro e em
fragmentos de frutos pós-colheita / José Luis França Pinto
Raduan ; orientador, Adriana Terumi Itako, 2017.
34 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Campus
Curitibanos, Graduação em Agronomia, Curitibanos, 2017.

Inclui referências.

1. Agronomia. 2. Controle alternativo. 3. Óleo
essencial. 4. Feijoa. I. Itako, Adriana Terumi. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em
Agronomia. III. Título.

José Luis França Pinto Raduan

**MÉTODOS DE CONTROLE DE *Colletotrichum* spp. EM *Acca sellowiana* (Berg)
Burret: AVALIAÇÃO *in vitro* E EM FRAGMENTOS DE FRUTOS PÓS-
COLHEITA**

Este Trabalho Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de Bacharel em Agronomia e aprovado em sua forma final pelo Curso de Graduação em Agronomia

Curitiba, 19 de junho de 2017.



Prof. Samuel Luiz Fioreze, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

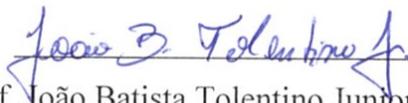


Prof.ª Adriana Terumi Itako, Dr.ª
Orientadora

Universidade Federal de Santa Catarina



Prof.ª Karine Louise dos Santos, Dr.ª
Universidade Federal de Santa Catarina



Prof. João Batista Tolentino Júnior, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por ter me dado saúde e determinação nos objetivos a serem conquistados.

Aos meus pais, Edilson e Maria Lucila, por terem-me apoio e incentivado nas minhas decisões e pela luta para me manterem durante o período de estudante.

Aos meus irmãos César, Arthur e Ana por me ajudarem e me confortarem nos momentos mais difíceis de manter-se longe de casa.

Aos amigos que me suportaram e apoiaram nos momentos mais difíceis.

A professora, orientadora Adriana Terumi Itako, pela confiança, ajuda, paciência e orientação durante a realização do trabalho de conclusão e durante toda a trajetória acadêmica.

Aos professores Karine Louise dos Santos e João Batista Tolentino Júnior por fazerem parte da banca de avaliação e por dicas que auxiliaram na conclusão do trabalho.

A EPAGRI (São Joaquim-SC) e a professora Karine por auxiliar para que o experimento fosse realizado através do fornecimento dos frutos. Aos demais professores que de uma forma ou outra contribuíram para a carreira profissional e pessoal.

Aos colegas de laboratório por ajudarem que este experimento fosse realizado.

A todos os colaboradores da Universidade Federal de Santa Catarina, pelo conhecimento passado de grande importância para a vida profissional e pessoal, e pela amizade conquistada.

RESUMO

A goiaba-serrana é uma espécie frutífera da família das mirtáceas originária da região sul do Brasil, e um dos principais entraves é a doença que acomete o cultivo e comercialização do fruto cultivado na região é a antracnose (*Colletotrichum* spp.) sendo que não existe produtos registrados para o controle. Com isso este trabalho teve o objetivo de avaliar a porcentagem de inibição *in vitro* e a capacidade de controle de germinação dos esporos contidos em fragmentos doentes de frutos. Para a avaliação *in vitro* foram utilizados os óleos essenciais de *Syzygium aromaticum*, *Cymbopogon citratus*, *Rosmarinus officinalis* e *Eucalyptus* spp. nas concentrações de 0, 250, 500 e 1000 ppm incorporados ao meio de cultura. As medições foram realizadas diariamente através do diâmetro da cultura micelial, após obtenção dos dados foi realizado o cálculo de porcentagem de inibição do crescimento micelial e realizado o teste de regressão a 5%. Já para os testes de controle de germinação dos esporos foram retirados fragmentos de frutos com a doença e submetidos a solução contendo os óleos essenciais de *S. aromaticum*, *C. citratus* e *Eucalyptus* spp. na concentração de 5000 ppm pelos tempos de 30 minutos e 1, 2, 4, 8, 12 e 24 horas e depositados em placas de Petri contendo meio ágar-ágar. A avaliação foi realizada diariamente até 15 dias após implantação do ensaio. A análises dos resultados foram realizadas através do teste Tukey_{5%} no 7º e 15º dias. No teste de inibição *in vitro* os óleos essenciais de cravo-da-índia e de capim-limão inibiram totalmente o desenvolvimento micelial a partir da dose de 1000 ppm, já os óleos de alecrim e eucalipto mostraram controle parcial nas doses testadas. No teste de germinação de esporos com fragmentos de frutos nos tempos de 0,5, 1, 2, 4, 8 horas de imersão não inibiu o seu desenvolvimento. Já os fragmentos mantidos por 12 e 24 horas com óleo essencial de cravo-da-índia obteve inibição total durante os 7 dias e parcial após 15 dias após implantação do ensaio. Os óleos essenciais de capim-limão e eucalipto obtiveram tanto com 12 e 24 horas de imersão um controle parcial da germinação dos esporos. Sendo assim mostra-se um potencial para o controle alternativo da antracnose da goiaba-serrana com a utilização de óleos essenciais, embora pesquisas com frutos devem ser feitas para a recomendação desses produtos.

Palavras chaves: Controle alternativo. Óleo essencial. Feijoa.

ABSTRACT

The pineapple-guava is a fruitful species of the family Myrtaceae originating in the southern region of Brazil, and one of the main obstacles is the disease that affects the cultivation and commercialization of the fruit grown in the region is the anthracnose (*Colletotrichum* spp.) and there are no registered products for control. The objective of this work was to evaluate the percentage of inhibition *in vitro* and the ability to control germination of spores contained in fragments of diseased fruits. The essential oils of *Syzygium aromaticum*, *Cymbopogon citratus*, *Rosmarinus officinalis* and *Eucalyptus* spp. were used for the *in vitro* evaluation. At the concentrations of 0, 250, 500 and 1000 ppm incorporated into the culture medium. The measurements were performed daily through the diameter of the mycelial culture, after obtaining the data the calculation of percentage of mycelial growth inhibition was performed and the regression test was performed at 5%. For the spore germination control tests, fruit fragments were removed with the disease and submitted to a solution containing the essential oils of *S. aromaticum*, *C. citratus* and *Eucalyptus* spp. In the concentration of 5000 ppm for the times of 30 minutes and 1, 2, 4, 8, 12 and 24 hours and deposited in Petri dishes containing agar medium. The evaluation was performed daily up to 15 days after the test. Results were analyzed using the Tukey 5% test on the 7th and 15th days. In the *in vitro* inhibition test the *S. aromaticum* and *C. citratus* essential oils totally inhibited the mycelial development from the dose of 1000 ppm, whereas the oils of *R. officinalis* and *Eucalyptus* showed partial control in the doses tested. In the test of germination of spores with fruit fragments at the times of 0.5, 1, 2, 4, 8 hours of immersion did not inhibit its development. The fragments maintained for 12 and 24 hours with *S. aromaticum* essential oil obtained complete inhibition during the 7 days and partial after 15 days after implantation of the assay. The essential oils of *C. citratus* and *Eucalyptus* obtained both partial control of spore germination with 12 and 24 hours of immersion. Therefore, a potential for the alternative control of guava anthracnose with the use of essential oils is shown, although fruit research should be done to recommend these products.

Key words: Alternative control. Essential oil. Feijoa.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Cultura pura de <i>Colletotrichum</i> spp. com esquema de medida de diâmetros perpendiculares da massa micelial	21
Figura 2 – Presença do micélio (germinação dos esporos) nos fragmentos tratados	23
Figura 3 – Porcentagem de inibição do crescimento micelial do fungo <i>Colletotrichum</i> spp. tratados com óleo essencial de cravo-da-índia (<i>S. aromaticum</i>) nas doses 0, 250, 500 e 1000 ppm	24
Figura 4 – Porcentagem de inibição do crescimento micelial do fungo <i>Colletotrichum</i> spp. tratados com óleo essencial de capim-limão (<i>C. citratus</i>) nas doses 0, 250, 500 e 1000 ppm	25
Figura 5 – Porcentagem de inibição do crescimento micelial do fungo <i>Colletotrichum</i> spp. tratados com óleo essencial de eucalipto (<i>Eucalyptus</i> spp.) nas doses 0, 250, 500 e 1000 ppm	26
Figura 6 – Porcentagem de inibição do crescimento micelial do fungo <i>Colletotrichum</i> spp. tratados com óleo essencial de alecrim (<i>R. officinalis</i>) nas doses 0, 250, 500 e 1000 ppm	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação do coeficiente de correlação das doses de óleos essenciais em relação a porcentagem de inibição do crescimento micelial através da classificação de Hopkins (2000)	28
Tabela 2 – Porcentagem de germinação micelial (%) em fragmentos de frutos de goiaba serrana imersos por 12 e 24 horas nos tratamentos com os óleos essenciais de cravo-da-índia, capim-limão e eucalipto.....	29

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REFERENCIAL TEORICO	16
2.1 GOIABA SERRANA (<i>Acca sellowiana</i>).....	16
2.2 ANTRACNOSE	16
2.3 CONTROLE DA ANTRACNOSE	17
2.4 CONTROLE ALTERNATIVO DE DOENÇAS EM PLANTAS	18
3 MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 OBTENÇÃO DOS FRUTOS	20
3.2 ISOLAMENTO FÚNGICO	20
3.3 OBTENÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS.....	20
3.4 TESTE DE DESENVOLVIMENTO <i>in vitro</i>	20
3.5 AVALIAÇÃO EM FRAGMENTOS DE FRUTOS DE GOIABA SERRANA	22
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
4.1 DESENVOLVIMENTO MICELIAL <i>in vitro</i>	23
4.2 AVALIAÇÃO DA GERMINAÇÃO DO FUNGO ATRAVÉS DE FRAGMENTOS DE FRUTOS <i>in vitro</i>	27
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	30
6 CONCLUSÕES.....	31
REFERÊNCIAS	32

1 INTRODUÇÃO

A goiaba-serrana (*Acca sellowiana* (Berg) Burret) é uma frutífera pertencente à família das mirtáceas. É uma espécie frutífera nativa do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Nordeste do Uruguai e Paraguai. Suas características organolépticas e de funcionalidade para saúde vêm despertando grandes interesses no mercado (AMARANTE; SANTOS, 2011).

A goiaba-serrana também é conhecida por goiaba-do-campo, goiaba-da-serra, goiabinha ou feijoa. No Uruguai se conhece por quirina, guayabo-verde ou guayabo-del-pais e na língua inglesa é conhecida como pineapple-guava (EPAGRI, 2009; AMARANTE; SANTOS, 2011).

A antracnose, causada pelas espécies do fungo *Colletotrichum* spp., é uma doença cosmopolita que no Brasil co-evoluiu com a cultura da goiaba-serrana e outras culturas, sendo o maior entrave para o cultivo comercial no país. Seu controle se faz basicamente por retirada do material infectado da área e aplicação de produtos à base de cobre (AMORIM et al., 2016).

Devido à falta de pesquisas em relação a manejos fitossanitários e de produtos indicados para a cultura da goiaba-serrana, a produção dos frutos no país de origem pode se tornar muito complexa inviabilizando o cultivo comercial (CARDOSO, 2009).

Pesquisas com óleos essenciais e extratos de plantas medicinais vêm apresentando influências sobre fungos fitopatogênicos, sendo de interesse para medidas de controle e para prevenção do desenvolvimento deste fungo em frutas (DEMARTELAERE; GUIMARAES; SILVA; LUNA; NASCIMENTO, 2015). Assim, o objeto desse trabalho foi avaliar os efeitos dos óleos essenciais de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), capim-limão (*Cymbopogon citratus*), eucalipto (*Eucalyptus* spp.) e alecrim (*Rosmarinus officinalis*) no desenvolvimento micelial do fungo *Colletotrichum* spp. e em fragmentos de frutos de *Acca sellowiana*.

2 REFERENCIAL TEORICO

2.1 GOIABA SERRANA (*Acca sellowiana*)

A *Acca sellowiana* é conhecida por goiaba-serrana, mas existem outros nomes comuns para esta frutífera como por exemplo goiaba-do-campo, goiaba-da-serra, goiabinha ou feijoa. No Uruguai é conhecida por guayabo verde e na língua inglesa de pineapple guava (SANTOS, 2011; EPAGRI, 2009).

Dentre as espécies frutíferas nativas da região sul do Brasil, a goiaba serrana vem despertando grande interesse no mercado devido as suas características organolépticas (AMARENTES; SANTOS, 2011) e vem sido estudada pela Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI) desde 1985, inicialmente na estação experimental de Videira e, a partir de 1990, na Estação Experimental de São Joaquim (SANTOS et al., 2011).

A goiaba-serrana é uma espécie nativa do Brasil e Uruguai, porém os países que mais produzem são a Colômbia e Nova Zelândia, tanto como planta ornamental como para produção de frutos para consumo *in natura* ou ingrediente para produtos como geleias, sucos, chocolates entre outros (EPAGRI, 2009). O Brasil é importador de frutos vindos da Colômbia, devido à pouca exploração comercial do fruto em sua região de origem (SANTOS, 2011; EPAGRI, 2009).

O manejo cultural da goiaba-serrana é relativamente simples e comum a outras frutíferas, sendo a colheita um ponto crucial para a entrada de patógenos principalmente nos frutos. O ponto de maturação é caracterizado pelo desprendimento dos frutos ligados a planta e, com isso, permite-se a entrada de patógenos que ainda não possuem produtos químicos registrados para prevenção (SANTOS et al., 2011).

2.2 ANTRACNOSE

Dentre as doenças que acometem a cultura, a antracnose é uma das mais importantes. Esta doença é causada por espécies do fungo *Colletotrichum* spp. (LOPES, 2013) e segundo CARDOSO (2009) é um dos principais entraves da produção comercial no país.

A antracnose é uma doença que tem sido relatada em centenas de espécies de plantas, sendo assim uma das que possuem maior importância para muitas culturas cultivadas (TOZZE JR., 2006). A infecção pode ocorrer em frutos ainda em fase de formação na forma direta de infecção através da formação do apressório e suas hifas permanecem quiescentes até o período

favorável para a germinação do fungo no fruto ou por forma indireta através de ferimentos (AMORIM et al., 2016).

O fungo *Colletotrichum* spp. tem como sua fase sexuada *Glomerella cingulata*, porém ainda não foi registrada no Brasil sua ocorrência nesta forma. (AMORIM et al., 2016).

O gênero apresenta acérvulos com espinhos ou setas, seus conidióforos são simples e alongados, os conídios possuem coloração hialinos unicelulares possuindo formatos ovalados ou oblongos. Os conídios nos acérvulos estão envolvidos por uma capa possivelmente protetora sendo gelatinosa constituída de polissacarídeos e proteínas solúveis em água, aumentando sua eficiência de germinação e penetração no tecido do hospedeiro (AMORIM et al., 2016).

O *Colletotrichum* spp. tem sido um problema pós-colheita para goiaba (*Psidium guajava* L.) (FISHER et al., 2012), e também são relatadas em hortaliças solanáceas como pimenta, pimentão, jiló, em frutíferas como manga, mamão, abacate e citros (GOES et al., 1997; TOZZE JR et al., 2006; AMORIM et al., 2016).

A antracnose se expressa após o amadurecimento do fruto e seus sintomas são pequenas manchas necróticas de cor marrom claras na casca dos frutos chegando até 1,5 cm de diâmetro (FISHER et al., 2012). Segundo TOZZE JR et al. (2005) o desenvolvimento da espécie *Colletotrichum* spp. está em torno de 25-28°C quando comparada com outras espécies do mesmo gênero. Porém segundo SANTOS et al. (2011) a umidade é um dos fatores que auxiliam no aparecimento da doença.

2.3 CONTROLE DA ANTRACNOSE

O controle efetivo de patógenos inicia-se pela escolha de sementes de boa qualidade, isentas do patógeno para que não haja infestação em locais livres da doença. O controle pode ser realizado de três formas: métodos químicos, físicos e biológicos (JUNQUEIRA; COSTA, 2002).

Segundo AMORIM et al. (2016) o controle da antracnose na goiaba (*Psidium guava*) tem sido realizado por tratos culturais durante o ciclo da cultura, tais como podas, espaçamento correto, manutenção e limpeza das plantas, queima dos resíduos e aplicação de fungicidas cúpricos, ainda se relata que os fungicidas benomyl e prochloraz são eficazes no controle da antracnose, mas não são registrados para esta cultura.

FISCHER et al. (2012) utilizaram até 100 mg i.a./litro de água e não verificaram o controle de *Colletotrichum* spp. em goiaba (*P. guajava*). Os autores relataram que o patógeno possuía uma resistência elevada ao trifloxistrobina+ tebuconazol.

Em goiaba-serrana o controle da antracnose se dá basicamente por manejos culturais como retiradas de galhos, folhas e frutos com inóculo do patógenos e queima do resíduo, pois não há relato de variedades resistentes e nem produtos químicos registrados para esta cultura (SANTOS et al., 2011).

2.4 CONTROLE ALTERNATIVO DE DOENÇAS EM PLANTAS

A agricultura tem aumentado a potencialidade de produção de alimentos levando ao um aumento na utilização produtos químicos, principalmente para o controle de doenças de plantas. Porém, o controle químico tradicional depara-se com o surgimento de isolados de patógenos resistentes às substâncias químicas utilizadas. Além disso, a resistência aos fungicidas tem conferido certa ineficiência no controle, incentivando a busca por produtos com modos alternativos de ação, que visam uma diminuição dos danos causados ao ambiente e aos seres vivos (FERNANDES; LEITE; MOREIRA, 2006; AMORIM; REZENDE; BERGAMIN FILHO, 2011).

A utilização em grande escala de defensivos químicos para o controle de doenças vem aumentando significativamente, e esse uso excessivo vem trazendo preocupações devido aos sérios problemas para a saúde humana ao consumir produtos com resíduos químicos (GHINI; KIMATI, 2002).

Pesquisas com plantas medicinais vêm sendo realizadas para controle ou proteção de doenças em plantas, onde tem se relatado respostas favoráveis no controle e proteção de plantas. A utilização dos produtos advindo das plantas medicinais podem ser tanto da forma de extratos brutos ou como óleos essenciais (NASCIMENTO; NERY; RODRIGUES, 2008; AQUINO et al., 2012; BARBOSA; VIEIRA; TEXEIRA, 2015; ANDRADE; VIEIRA, 2016).

Há várias pesquisas realizadas na busca de métodos alternativos no controle de doenças em plantas e os estudos com extrato bruto ou óleo essencial obtidos de plantas têm indicado o potencial das mesmas no controle de fitopatógenos, tanto pela indução de resistência, com a produção de fitoalexinas ou lignificação da parede celular, como por sua ação fungitóxica direta (AMORIM; REZENDE; BERGAMIN FILHO, 2011; BONALDO et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2009; AFFONSO et al., 2012; VELOSO et al., 2012).

Como exemplos, temos o trabalho de AQUINO (2012), em que verificou que os óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* (capim-limão), *Lippia sidoides* (alecrim-pimenta) e *Ocimum gratissimum* (alfavaca-cravo) são tão eficientes quanto o fungicida tebuconazol no controle pós-colheita de *Colletotrichum gloeosporioides* em maracujazeiro-amarelo. Segundo SOUZA, (2012) óleos essenciais como o de eucalipto (*Eucalyptus* spp.), copaíba (*Copaifera langsdorffii*), andiroba (*Carapa guianensis*), neem (*Azadirachta indica*), hortelã (*Mentha* spp.) possuem efeitos sobre a doença da antracnose em pimenta. Estudos realizados por SOUZA JR (2009) demonstraram que as espécies *L. sidoides* (alecrim-pimenta), *O. gratissimum* (alfavaca-cravo), *Lippia citriodora* (Lúcia-lima), *C. citratus* (capim-limão) inibiram em 100% o crescimento micelial do fungo e os óleos essenciais de todas as espécies vegetais tiveram efeito sobre a germinação dos conídios, com inibição de 100%. O óleo da goiabeira (*Psidium guayava* var. *pomifera*) mostrou inibição crescente sobre o micélio do *C. gloeosporioides* com o aumento das concentrações desse óleo essencial.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DOS FRUTOS

Os frutos de goiaba serrana doentes da cultivar Alcântara, apresentando sintomas de antracnose, foram obtidos da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI) da Estação Experimental de São Joaquim – SC.

3.2 ISOLAMENTO FÚNGICO

O fungo *Colletotrichum* spp. foi isolado de frutos doentes de goiaba-serrana e armazenado em meio de cultura BDA (Batata-Dextrose-Ágar), incubado a 25°C com fotoperíodo de 12 horas. O isolado fúngico foi mantido no Laboratório de Fitopatologia do Campus de Curitibanos.

3.3 OBTENÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), capim-limão (*Cymbopogon citratus*), eucalipto (*Eucalyptus* spp.) e alecrim (*Rosmarinus officinalis*) foram adquiridos comercialmente.

3.4 TESTE DE DESENVOLVIMENTO *in vitro*

Para avaliar o efeito *in vitro* dos óleos essenciais, foi preparado o meio de cultura BDA e autoclavado. Com o meio ainda fundente, foram adicionados em todas as parcelas o Tween 20% para a solubilidade do óleo essencial em água, o antibiótico (estreptomicina e penicillina) para evitar o crescimento de bactérias. Também foram adicionados os óleos essenciais, nas doses crescentes de 0, 250, 500 e 1000 ppm. Após a solidificação do meio, foi depositado um disco micelial de 6 mm de diâmetro da cultura pura do fungo *Colletotrichum* spp. no centro da placa. As placas foram vedadas e mantidas em incubadora de crescimento (B.O.D.) a temperatura de 25°C.

As avaliações foram realizadas diariamente e os dados foram obtidos pela medição dos diâmetros perpendiculares (Figura 1). Com os dados foi determinado a porcentagem de inibição

do crescimento (PIC) dos tratamentos em relação à testemunha utilizando a seguinte fórmula, segundo BASTOS, (1997).

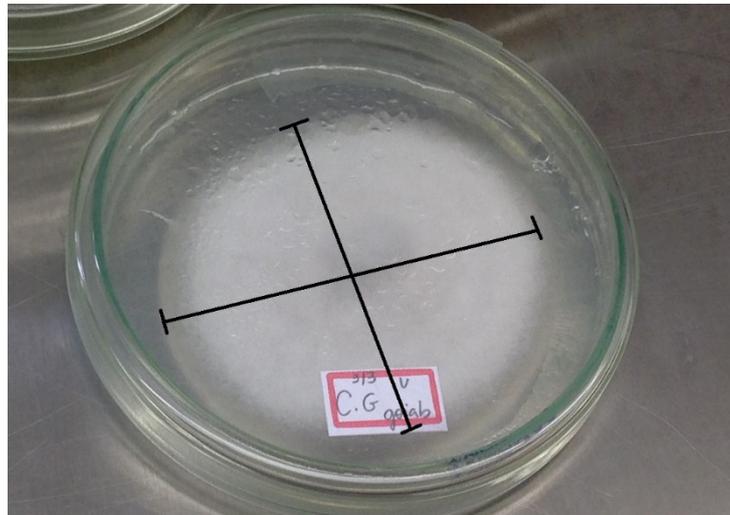
$$\text{PIC} = \frac{\text{diâmetro da testemunha} - \text{diâmetro do tratamento}}{\text{diâmetro da testemunha}} * 100$$

onde:

PIC= porcentagem de inibição do crescimento micelial

As medições diárias foram realizadas até que 80% do crescimento micelial do tratamento testemunha atingisse a extensão da placa de Petri para minimizar o erro em relação a nutrientes disponíveis no meio de cultura.

Figura 1. Cultura pura do fungo *Colletotrichum* spp. em meio de cultura BDA. Esquema de medida dos diâmetros perpendiculares do crescimento micelial.



Fonte: Autor,2017.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial utilizando quatro tratamentos (óleos essenciais de cravo-da-índia, capim-limão, eucalipto e alecrim) e quatro doses crescentes, considerando a dose 0 como testemunha. Foram utilizadas cinco repetições e cada parcela experimental foi constituída por uma placa de Petri. Os dados foram submetidos à análise de coeficiente de correlação (r) e o resultado foi classificado conforme HOPKINS (2000), e em seguida feito análise de regressão para a porcentagem de inibição em relação às doses no software ASSISTAT.

3.5 AVALIAÇÃO EM FRAGMENTOS DE FRUTOS DE GOIABA SERRANA

Foram utilizados frutos de goiaba-serrana obtidos da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI-SC) de São Joaquim. Os frutos da cultivar Alcântara foram selecionados com lesões características da doença antracnose.

Para a avaliação dos tratamentos com os óleos essenciais em diferentes tempos de imersão, fragmentos de 4-6 mm foram retirados na área lesionada de frutos apresentando sintomas da doença. Os fragmentos foram previamente desinfestados superficialmente com álcool 70% (1 minuto) e posteriormente com hipoclorito de sódio a 2% (2 minutos) e enxaguados em água destilada esterilizada. Após a desinfecção superficial, os fragmentos foram imersos em solução aquosa dos óleos essenciais de *S. aromaticum*, *C. citratus* e *E. citriodora* na concentração de 5000 ppm.

Os fragmentos, após a imersão, foram dispostos de maneira equidistante (3 fragmentos) em placas de Petri contendo meio de cultura Ágar-ágar (AA). As placas foram vedadas e colocadas em BOD com temperatura de 25 °C. A avaliação foi realizada diariamente durante o período de 15 dias após tratamento. A avaliação consistiu em verificar a presença ou não do micélio do fungo (Figura 2).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial com quatro tratamentos (cravo-da-índia, capim-limão, eucalipto e testemunha) e sete tempos de imersão (0,5, 1, 2, 4, 8, 12 e 24 horas), com quatro repetições. Cada unidade experimental foi constituída por uma placa de Petri contendo 3 fragmentos dos frutos). Os dados foram submetidos a análise de variância e análise de Tukey a 5 % de probabilidade.

Figura 2. Fragmentos dos frutos com a presença do micélio (germinação)



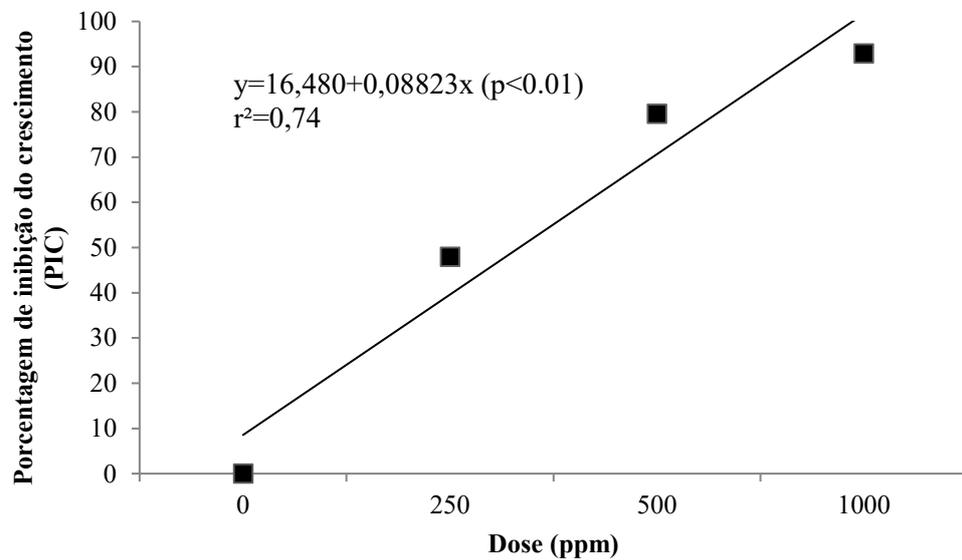
Fonte: Autores, 2017

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 DESENVOLVIMENTO MICELIAL *in vitro*

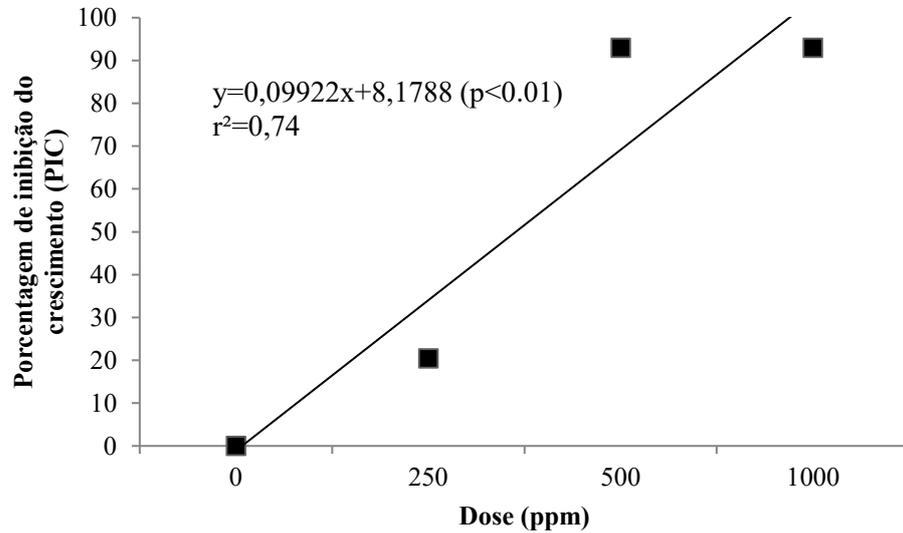
Com os dados obtidos foi possível verificar que o óleo essencial de cravo-da-índia inibiu o desenvolvimento do fungo com o aumento das doses, ocorrendo inibição do desenvolvimento micelial total na concentração de 1000 ppm conforme a Figura 3.

Figura 3. Porcentagem de inibição do crescimento micelial do fungo *Colletotrichum* spp. tratados com o óleo essencial de cravo-da-índia (*S. aromaticum*) nas doses 0, 250, 500 e 1000 ppm.



Para o óleo essencial de capim-limão a inibição total do crescimento fúngico foi obtida a partir da dose de 500 ppm (Figura 4), observando uma relação entre o aumento das doses e o aumento da porcentagem de inibição do crescimento micelial.

Figura 4. Porcentagem de Inibição do crescimento micelial do fungo *Colletotrichum* spp. tratados com o óleo essencial de capim-limão (*C. citratus*) nas doses 0, 250, 500 e 1000 ppm.



Foi possível observar que nos tratamentos com os óleos essenciais de eucalipto e alecrim ocorreu uma porcentagem de inibição menor em relação aos outros óleos, não obtendo inibição total do crescimento micelial nas doses testadas. Foram obtidas inibições parciais independente da concentração, sendo que no tratamento com óleo essencial de eucalipto a maior inibição obtida foi de 44% na dose de 1000 ppm (Figura 5) e para o com óleo essencial de alecrim (Figura 6), obteve-se uma inibição de 59% com a dose de 1000 ppm.

Figura 5. Porcentagem de inibição do crescimento micelial do fungo *Colletotrichum* spp. tratados com o óleo essencial de eucalipto (*Eucalyptus* spp.) nas doses 0, 250 500 e 1000 ppm.

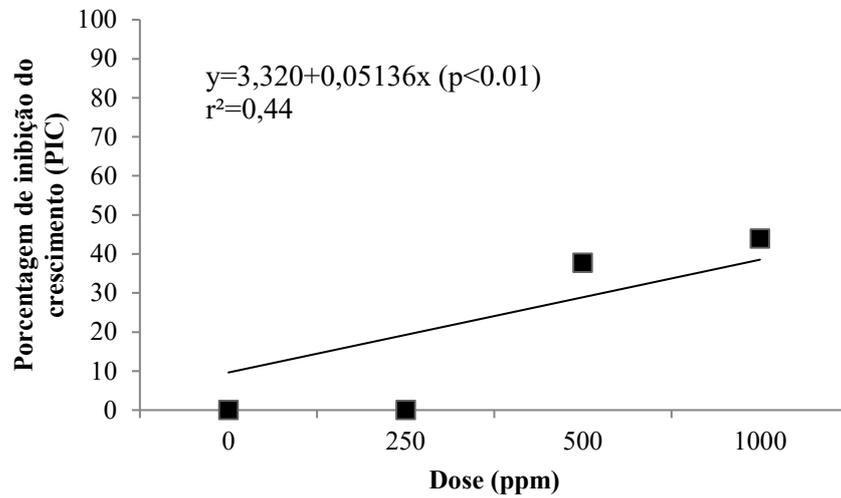
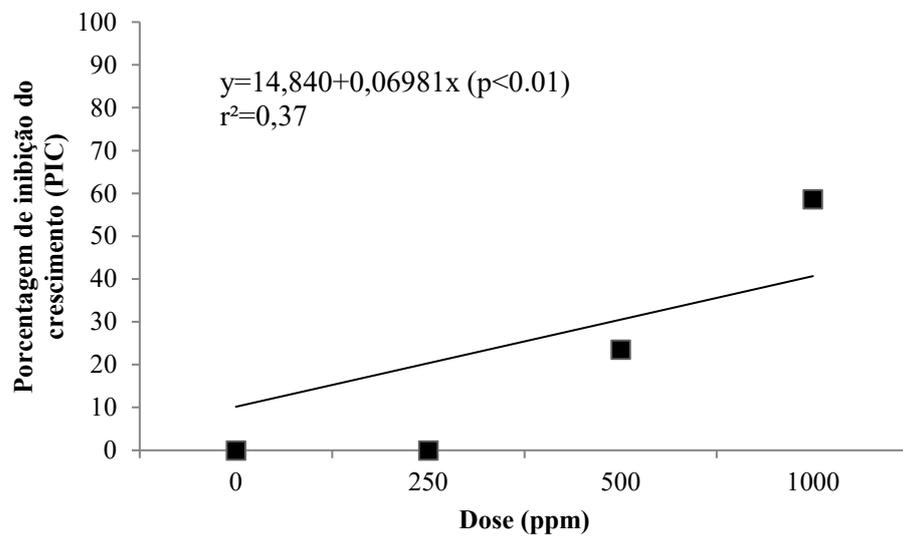


Figura 6. Porcentagem de inibição do crescimento micelial do fungo *Colletotrichum* spp. tratados com o óleo essencial de alecrim (*R. officinalis*) nas doses 0, 250, 500 e 1000 ppm.



Após a análise dos dados, foram obtidos os coeficientes de correlação entre as doses dos óleos essenciais e a porcentagem de inibição do crescimento micelial do fungo *Colletotrichum* spp., sendo possível classificar a relação entre as duas variáveis do experimento (Tabela 1).

Os óleos essenciais de cravo-da-índia e de capim-limão apresentaram uma correlação muito forte entre o aumento da dose e a porcentagem de inibição do crescimento micelial do fungo. Já os óleos essenciais de eucalipto e de alecrim apresentaram uma correlação forte entre a dose e a porcentagem de inibição do crescimento micelial.

Tabela 1. Classificação do coeficiente de correlação das doses de óleos essenciais em relação a porcentagem de inibição do crescimento micelial através da classificação de Hopkins (2000).

Óleo essencial	Coefficiente de correlação (r)	Classificação
Cravo-da-índia	0,86	Muito Forte
Capim-Limão	0,86	Muito Forte
Eucalipto	0,66	Forte
Alecrim	0,61	Forte

Fonte: Autores.

Os óleos essenciais de cravo-da-índia e o capim-limão apresentaram inibição total do crescimento do fungo corroborando com os estudos de ROZWALKA et al. (2008), em que obtiveram um controle total de *C. gloeosporioides* isolado de goiaba (*P. guava*). BARBOSA, VIEIRA e TEXEIRA (2015) utilizando em seu experimento vários óleos essenciais, entre eles o óleo essencial de cravo-da-índia, e verificaram a inibição total do desenvolvimento do fungo *Colletotrichum musae*, isolado da cultura da banana. Esses resultados mostram que o cravo-da-índia apresenta uma alta eficiência de controle sobre espécies de fungo do gênero *Colletotrichum*.

Já em estudos com óleo essencial de capim-limão SILVA et al. (2009) obtiveram inibição total de fungo *C. gloeosporioides* com o óleo de capim-limão. SOUZA Jr. et al. (2009) obtiveram inibição total do crescimento micelial do fungo *Colletotrichum* spp. com os óleos essenciais de capim-limão (*C. citratus*) entre outros.

Em seu experimento VELOSO et al. (2012) verificaram o efeito no crescimento micelial do óleo essencial de capim citronela (*Cymbopogon nardus*), na dose de 30 μ L, quando adicionados superficialmente sobre o meio. Os mesmos autores realizaram a análise

cromatográfica dos componentes deste óleo e verificaram que o principal composto presente era o citronelol. Este composto possui como característica atividade fungitóxica, controlando também outras espécies de fungo como *Amphobotrys ricini* e *Didymella bryonae*, mostrando que mais espécies de plantas do gênero *Cymbopogon* podem ter compostos que auxiliam no controle do desenvolvimento do fungo assim como o capim-limão.

De acordo com BARBOSA, VIEIRA e TEXEIRA (2015) testando vários óleos essenciais, verificaram que o óleo de eucalipto apresentou baixa eficiência no controle do fungo *C. musae* isolado de banana. Assim, observa-se que o óleo de eucalipto apresenta uma baixa eficiência no controle de fungos do gênero *Colletotrichum* confirmando os dados encontrados nesta pesquisa.

Segundo AQUINO et al. (2012) o óleo essencial de capim-limão na concentração de $6\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ e os óleos de alecrim-pimenta (*L. sidoides*) e alfavaca-cravo na concentração de $8\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ inibiram o desenvolvimento do fungo *Colletotrichum* spp., sendo os principais componentes encontrados nesses óleos foram o citral, timol e o eugenol, respectivamente. Sendo assim mostrando a eficiência do óleo de capim-limão no controle do fungo *Colletotrichum* spp.

Além dos óleos essenciais, os extratos podem ser uma alternativa para inibição do desenvolvimento do fungo. SILVA et al. (2009), utilizando o extrato bruto de alecrim, verificaram a inibição total do fungo da espécie *C. gloeosporioides*. Já BRAND et al. (2010) obtiveram inibição total do fungo *Colletotrichum lindemuthianum* com o extrato de alecrim a inibição na concentração de 18,6%, mas se observou que o extrato de alecrim teve maior influência na indução de mecanismos de resistência na planta de feijão.

4.2 AVALIAÇÃO DA GERMINAÇÃO DO FUNGO ATRAVÉS DE FRAGMENTOS DE FRUTOS *in vitro*

Os tratamentos com o tempo de imersão de 30 minutos, 1, 2, 4, 8 horas não apresentaram diferença entre a testemunha, tendo uma germinação dos esporos (crescimento micelial) no mesmo período que o testemunha (dados não mostrados).

Já os fragmentos imersos pelo período de 12 horas apresentaram diferenças na porcentagem de germinação em relação a testemunha nos primeiros 7 dias após tratamento. No 15° dia após tratamento a porcentagem de germinação não apresentou diferença (Tabela 2).

Já os fragmentos imersos pelo período de 24 horas nos óleos essenciais de cravo-da-índia e capim-limão demonstraram uma porcentagem de 0 e 8,28 % de germinação, respectivamente, no 7º dia. No 15º dia ocorreu a germinação em 16,5; 33,25; 45,75% nos tratamentos com cravo, capim-limão e eucalipto, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2. Porcentagem de germinação micelial (%) em fragmentos de frutos de goiaba serrana imersos por 12 e 24 horas nos tratamentos com os óleos essenciais de cravo-da-índia, capim-limão e eucalipto.

Dias após tratamento	Tempo de Imersão			
	12 horas		24 horas	
	7	15	7	15
Testemunha	100 a	100 a	100 a	100 a
Cravo-da-índia	0 b	8,25 b	0 b	16,50 b
Capim-limão	24,7 b	58,2 ab	8,25 b	33,25 ab
Eucalipto	41,5 b	50,0 ab	33,0 b	45,75 ab
CV%	71,04	72,22	44,74	72,70

Médias seguidas de letras iguais não diferiram entre si pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$).

Com os resultados observa-se que com o passar do tempo (em dias) após exposição dos fragmentos, o óleo essencial reduziu sua capacidade de inibir o micélio do fungo, onde as células podem ter consumido todo o princípio ativo do óleo ou ocorreu perda por volatilização da própria substância por se tratar de um composto altamente volátil.

NEGREIROS et al. (2013) avaliando a incidência do fungo *C. musae* em frutos de banana através do tratamento com óleo de alho (*A. sativum*) e de pimenta-longa (*Piper longum*), verificaram a eficiência destes na redução apenas da incidência. Já o óleo de cravo-da-índia inibiu pela metade a incidência do fungo nos frutos. Com isso mostra-se que os resultados encontrados na presente pesquisa se assemelham aos obtidos por outros pesquisadores, verificando um possível potencial do óleo de cravo.

AQUINO et al. (2012) em experimento com frutos de maracujá tratados com óleos essenciais obtiveram resultados significativos com os óleos essenciais de capim-limão, entre outros, que inibiram totalmente o desenvolvimento da lesão de antracnose causada por *Colletotrichum* spp. na concentração de 8µL/mL. Já SARMENTO-BRUM et al. (2013) avaliaram o efeito protetor de óleos essenciais no controle da antracnose na cultura do sorgo,

verificando que as plantas tratadas com a concentração de 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ do óleo essencial de capim-limão não apresentaram os sintomas. ANDRADE e VIEIRA (2016) obtiveram inibição total do diâmetro da lesão de antracnose em frutos de mamão com a concentração de 30 μL com o óleo essencial de cravo-da-índia e de alecrim.

De acordo com SOUZA et al. (2012) houve inibição parcial no desenvolvimento da antracnose causada pelo fungo *Colletotrichum* spp. em pimenta com a utilização de óleo essencial de eucalipto (*Eucalyptus* spp.) quando tratados com concentração de 1% dose superior ao utilizado nesse experimento sendo duas vezes maior a concentração da solução.

OLIVEIRA et al. (2009) caracterizaram os compostos químicos das especiarias e observaram que o óleo de cravo-da-índia possui uma alta concentração de eugenol, que é o principal componente que possui atividade antifúngica, antimicrobiana, entre outros. AFFONSO et al. (2012), relataram que esse composto do óleo essencial penetra nos tecidos até 100 vezes mais rápido em relação a água, explicando a atividade antifúngica do eugenol. Segundo VELOSO et al. (2012) avaliando os componentes do óleo essencial de capim-limão (*C. citratus*) observaram que o principal componente é o citronelol. Assim, a inibição do fungo no presente trabalho, pode ter ocorrido pela presença majoritária destes compostos nos óleos essenciais de cravo-da-índia e capim-limão.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com esse trabalho foi possível perceber que na profissão de engenheiro agrônomo devemos buscar sempre uma alternativa na produção de alimentos com qualidade e com o mínimo de dano ao meio ambiente, buscando sempre a melhoria profissional na área de atuação.

Alternativas aos manejos fitossanitários devem ser utilizadas sempre pensando no manejo integrado de doenças para evitar o aparecimento de patógenos resistentes, evitando problemas futuros na produção de alimentos, assim garantindo uma vida de melhor qualidade para toda população.

6 CONCLUSÕES

Conclui-se que os tratamentos com óleos essenciais de cravo-da-índia (*S. aromaticum*), capim-limão (*C. citratus*), eucalipto (*Eucalyptus* spp.) e alecrim (*R. officinalis*) possuem atividade antifúngica na cultura *in vitro* referente ao desenvolvimento micelial do fungo *Colletotrichum* spp.

Os fragmentos tratados com os óleos essenciais de cravo-da-índia (*S. aromaticum*), capim-limão (*C. citratus*) mostraram uma grande possibilidade de inibição dos esporos quiescentes nos fragmentos dos frutos reduzindo o aparecimento e o desenvolvimento micelial do fungo *Colletotrichum* spp.

Estudos complementares com os frutos inteiros devem ser realizados para obter se há mudanças nas características organolépticas dos frutos e aspectos de casca, sabor e aroma e entre outras.

REFERÊNCIAS

- AFFONSO, R. S.; RENNÓ, M. N.; SLANA, G. B. C. A.; FRANÇA, T. C. C. Aspectos Químicos e Biológicos do Óleo Essencial de Cravo da Índia. *Revista Virtual de Química*, 2012, v. 4, n. 2, p. 146-161. Data de publicação na Web: 14 de maio de 2012. Disponível em: <http://www.uff.br/rvq>
- AMARANTE, CVT.; SANTOS, K. L. Goiabeira-serrana (*Acca sellowiana*) **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 1, 2011.
- AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 4. Ed v.1, p. 704. São Paulo Ceres, 2011.
- AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. **Manual de fitopatologia**. 5. Ed v.2, p. 820. São Paulo Ceres, 2016.
- ANDRADE, 2.P.; VIEIRA, G.H.C. Efeito dos óleos essenciais sobre a antracnose *in vitro* e em frutos de mamoeiro. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v.18, n.1, supl. I, p.367-372, 2016.
- AQUINO, C. F.; SALES, N. de L. P.; SOARES, E.P.S.; MARTINS, E.R. Ação e caracterização química de óleos essenciais no manejo da antracnose do maracujá. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 34, n. 4, p. 1059-1067, 2012.
- BASTOS, C.N. Efeito do óleo de *Piper aduncum* sobre *Crinipelis* e outros fungos fitopatogênicos. **Fitopatologia Brasileira**, v.22, n.3, p.441-3, 1997.
- BRAND, S.C.; BLUME, E. MUNIZ, M. F. B.; MILANESI, P. M.; SCHEREN, M. B.; ANTONELLO, L. M. Extratos de alho e alecrim na indução de faseolina em feijoeiro e fungitoxicidade sobre *Colletotrichum lindemuthianum*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n.9, p. 1881-1887, 2010.
- CARDOSO, J. H. **Cultivo e conservação da feijoa: uma homenagem a um agricultor guardião**. Pelotas: Embrapa, 2009. 26 p. disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/747166/1/documento288.pdf> acessado 20/05/2017.
- DIAS, J. N.; SILVA, M. P. C. F.; LIMA, I.P.C. O uso de fitoterápicos à base de aroeira como coadjuvante no tratamento da gengivite: Revisão Sistemática. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v. 17, p.1187-1191, 2015.
- EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA E EXTENSÃO RURAL DE SANTA CATARINA. Conhecimento popular e diversidade da goiabeira-serrana (*Acca sellowiana*) na Serra Catarinense. Florianópolis, 2009. (Boletim didático, 83).
- FERNANDES, M. do C. de A.; LEITE, E. C. B.; MOREIRA, V. E. Defensivos alternativos: ferramenta para uma agricultura ecológica, não poluente, produtora de alimentos saudáveis. Niterói: PESAGRO-RIO, 2006. 22p. (PESAGRO-RIO. Informe Técnico, 34).

FISCHER, I.H.; da SILVA, B.L.; SOARES, A.R.; de ARRUDA, M.C.; PARISI, M.C.M.; AMORIM, L. Efeito de fungicidas e produtos alternativos no controle da antracnose e da pinta preta da goiaba, **Semina: Ciência agrária**, Londrina, v33, suplemento 1, p.2753-2766, 2012.

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

GOES, A.; KIMATI, H. Caracterização morfológica de isolados de *Colletotrichum cutatum* e *Colletotrichum gloeosporioides* associados à queda prematura dos frutos cítricos. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v.23, n.1, p.4-10, 1997.

HUPKINS, W.G. A new view of statistic: a scale of magnitudes for effect statistics. 2002. Disponível em: <http://sportsci.org/resource/stats/effectmag.html> acessado 04/11/2016.

JUNQUEIRA, N. T. V.; COSTA, H. Controle das doenças da goiabeira. In: ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R.; MONTEIRO, A. J. A.; COSTA, H. **Controle de doenças de plantas: fruteiras**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2002. v. 2, p. 1247-1277.

LOPES, M. E. **Caracterização morfológica de isolados de *Colletotrichum* spp., agente causal da antracnose em goiabeira-serrana (*Acca sellowiana*) (O. Berg.) Burret.** 2013. 110 f. Tese (mestrado)- Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Florianópolis, 2013.

NASCIMENTO, L. C, de; NERY, A. R.; RODRIGUES, L.N. Controle de *Colletotrichum gloeosporioides* em mamoeiro, utilizando extratos vegetais, indutores de resistência e fungicidas. **Acta Science Agronomica**. V. 30, n. 3, p. 313- 319. Maringá, 2008.

NEGREIROS, R.J.Z.; SALOMÃO, LCC; PEREIRA, OL; CECON, PR; SIQUEIRA, D.L. Controle da antracnose na pós-colheita de bananas- 'prata' com produtos alternativos aos agrotóxicos convencionais. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 35, n. 1, p. 051-058, 2013.

OLIVEIRA, RA; REIS, TV; SACRAMENTO, CK; DUARTE, LP; OLIVEIRA, FF. Constituintes voláteis de especiarias ricas em eugenol. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n. 3, p. 771-775, 2009.

RADUAN, J.L.F.P. Arquivo pessoal. Curitiba. 2016.

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

SANTOS, K. L. **Diversidade cultural, genética e fenotípica da goiabeira-serrana (*Acca sellowiana*): implicações para a domesticação da espécie.** 2009. 163 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Florianópolis, 2009.

SANTOS, K. L.; DUCROQUET, J. P. H. J.; NAVA, G.; AMARANTE, C. V. T. do; SOUZA, S. N. de; PERONI, N.; GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. Orientações para o cultivo da goiabeira-serrana (*Acca sellowiana*). Florianópolis: Epagri, 2011. (Boletim técnico nº153)

SARMENTO-BRUM, R. B. C.; SANTOS, G. R.; CASTRO, H. G.; GONÇALVES, C. G.; JÚNIOR, A. F. C.; NASCIMENTO I. R. efeito de óleos essenciais de plantas medicinais sobre a antracnose do sorgo. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 29, Suplemento 1, p. 1549-1557, 2013.

SILVA, A.C.; SALES, N. L. P.; ARAUJO, A.V.; CALDEIRA Jr., C.F. Efeito *in vitro* de compostos de plantas sobre o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. Isolado do maracujazeiro. **Ciência Agrotecnológica**, Lavras, v. 33, Edição Especial, p. 1853 -1860, 2009.

SOUSA, R.M.S; SERRA, I.M.R.S; MELO, T.A. Efeito de óleos essenciais como alternativa no controle de *Colletotrichum gloeosporioides*, em pimenta. **Summa Phytopathologica**, v.38, n.1, p.42-47, 2012.

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

TOZZE JR., H.J.; MELLO, M.B.A.; MASSOLA Jr., N.S. Caracterização morfológica e fisiológica de isolados de *Colletotrichum* sp. causadores de antracnose em solanáceas. **Summa Phytopathologica**, v. 32, n. 1, p. 71-79, 2006.

VELOSO, R.A.; CASTRO, H.G. de; CARDOSO, D.P.; SANTOS, G.R. dos; BARBOSA, L.C. de A.; SILVA, K. P. da. Composição e fungitoxicidade do óleo essencial de capim citronela em função da adubação orgânica. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v47, n. 12, p. 1707-1713, 2012.