

DANIELE MARIA DO NASCIMENTO

**EFEITO DO TRATAMENTO DE SEMENTES DE PIMENTÃO COM ÓLEOS
ESSENCIAIS SOBRE O CONTROLE DE *Colletotrichum gloeosporioides* E O
POTENCIAL FISIOLÓGICO DAS SEMENTES**

Botucatu

2017

DANIELE MARIA DO NASCIMENTO

**EFEITO DO TRATAMENTO DE SEMENTES DE PIMENTÃO COM ÓLEOS
ESSENCIAIS SOBRE O CONTROLE DE *Colletotrichum gloeosporioides* E O
POTENCIAL FISIOLÓGICO DAS SEMENTES**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da Unesp Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Proteção de Plantas.

Orientadora: Adriana Zanin Kronka

Botucatu

2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - DIRETORIA TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

Nascimento, Daniele Maria do, 1992-
N241e Efeito do tratamento de sementes de pimentão com óleos essenciais sobre o controle de *Colletotrichum gloeosporioides* e o potencial fisiológico das sementes / Daniele Maria do Nascimento. - Botucatu : [s.n.], 2017
64 p. : il., grafs., tabs.

Dissertação (Mestrado)-Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônomicas, Botucatu, 2017
Orientador: Adriana Zanin Kronka
Inclui bibliografia

1. Antracnose. 2. Pimentão. 3. Antifúngicos. 4. Óleos essenciais. 5. *Colletotrichum gloeosporioides*. I. Kronka, Adriana Zanin. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Câmpus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônomicas. III. Título.

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte"

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: EFEITO DO TRATAMENTO DE SEMENTES DE PIMENTÃO COM ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE CONTROLE DE *Colletotrichum gloeosporioides* E O POTENCIAL FISIOLÓGICO DAS SEMENTES

AUTORA: DANIELE MARIA DO NASCIMENTO

ORIENTADORA: ADRIANA ZANIN KRONKA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em AGRONOMIA (PROTEÇÃO DE PLANTAS), pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. ADRIANA ZANIN KRONKA
Depto de Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrônomicas - UNESP



Professora Doutora DANILA COMELIS BERTOLIN
Depto. Agronegócio / FATEC SÃO JOSÉ DO RIO PRETO



Prof. Dr. ANTONIO ISMAEL INÁCIO CARDOSO
Dep de Horticultura / Faculdade de Ciências Agrônomicas de Botucatu

Botucatu, 21 de fevereiro de 2017

A Deus, por me guiar durante toda essa caminhada e por me dar força e sabedoria para concretizar mais essa etapa.

OFEREÇO

DEDICO

A minha mãe, Maria Josilene, por sempre ter me incentivado a lutar pelos meus sonhos, pela confiança a mim depositada, pelo apoio incondicional e, principalmente, pelo exemplo de vida.

Ao meu pai, Jorge Marcos (in memoriam), que mesmo ausente, é quem me dá forças a nunca desistir.

A minha irmã, Dayane, meu cunhado Rodrigo, e minha sobrinha Nina, por compreenderem a minha ausência e me apoiarem sempre.

A Fabiana, Milton e Cadu, por sempre me acolherem e por todo o incentivo e apoio.

Ao meu amado namorado Marcos, por todo amor, carinho, cumplicidade e compreensão

Amo vocês

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Adriana Zanin Kronka, pela orientação.

Aos membros da banca de defesa, Antonio Ismael I. Cardoso e Danila Comelis, por aceitarem o convite para contribuir com meu trabalho.

A Paula Leite dos Santos, pelo carinho, companheirismo, dedicação. Pelos ensinamentos a mim repassados e pelo auxílio em todas as etapas da execução deste trabalho, sendo imprescindível em sua conclusão, mas, sobretudo, pelos momentos de descontração e amizade.

Ao João e Marcelo, por me auxiliarem sempre que necessitei, meu muito obrigado

À Giovana Cruciol, pelo apoio, carinho, dedicação e amizade.

Ao Marcos, pela companhia, auxílio e apoio inestimáveis.

Aos colegas do Departamento de Proteção Vegetal, Mônica, Késia e Rafaela pelos momentos de descontração e amizade.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Agrônomicas – Campus de Botucatu, e ao Departamento de Defesa Fitossanitária pela oportunidade da realização do curso de mestrado.

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

RESUMO

O pimentão (*Capsicum annum* L.) é uma das hortaliças mais consumidas no mercado brasileiro, contudo, uma importante doença fúngica, a antracnose, pode dizimar todos os seus frutos em campo, caso ocorram condições favoráveis ao seu estabelecimento. A antracnose é causada por um complexo de espécies do gênero *Colletotrichum*, podendo o fungo ser transmitido via semente, constituindo-se essa em um importante meio de introdução e disseminação do patógeno em novas áreas. O tratamento das sementes torna-se, então, uma medida importante no manejo e controle desta doença. Visando diminuir a aplicação de produtos químicos, a pesquisa por substâncias naturais com ação antifúngica vem sendo estimulada. Neste trabalho, foi investigada a ação de oito óleos essenciais (alecrim, citronela, cravo, copaíba, eucalipto, hortelã, manjerição e *tea tree*) sobre *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado do pimentão. Inicialmente, foi avaliada a atividade *in vitro* dos óleos essenciais sobre o fungo, adicionando-os ao meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) contido em placas de Petri, nas concentrações 0,25%, 0,50% e 0,75%. Em seguida, o fungo foi transferido para o centro de cada placa de Petri contendo os tratamentos. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, segundo o esquema fatorial 8x3 (oito óleos essenciais x três concentrações), e um tratamento testemunha (composto por BDA puro), e três repetições. O experimento foi conduzido em duplicata. As placas foram mantidas a 22°C e fotoperíodo de 12 horas. Para verificar o efeito dos óleos essenciais, o crescimento micelial (diâmetro das colônias), a porcentagem de inibição do crescimento (PIC) e a esporulação (número de esporos/mL) foram avaliados. Nos dois ensaios, os óleos essenciais de cravo, citronela, eucalipto, hortelã e manjerição, independente da concentração empregada, inibiram totalmente o patógeno, não permitindo a esporulação deste. A segunda etapa do trabalho objetivou estudar a ação dos cinco óleos essenciais anteriormente selecionados sobre a qualidade sanitária e fisiológica de sementes de pimentão infectadas por *Colletotrichum gloeosporioides*. Para o tratamento das sementes, cada óleo essencial foi emulsionado na concentração de 0,25% em solução de água destilada autoclavada + Tween 80. Foram avaliadas a qualidade sanitária das sementes (*blotter test*) e a qualidade fisiológica (germinação, comprimento de plântulas, emergência de plântulas, índice de velocidade de emergência e massa seca). O óleo essencial de cravo foi o mais eficiente em reduzir a incidência do fungo nas sementes, sem prejudicar a qualidade fisiológica destas. A ocorrência de *C. gloeosporioides* nas sementes tratadas com os demais óleos essenciais foi alta, tendo o de citronela também interferido negativamente na germinação.

Palavras-chave: Antracnose, atividade antifúngica, *Capsicum annum*, substâncias naturais.

ABSTRACT

Sweet pepper (*Capsicum annum*) is one of the most consumed vegetables in the Brazilian market, however, an important fungal disease, anthracnose, can decimate all its fruits in the field. The anthracnose is caused by a complex of species of the genus *Colletotrichum*, and the fungus can be transmitted by infected seeds, constituting an important means of introducing and disseminating the pathogen in new areas. Then, seed treatment becomes an important measure for anthracnose management and control. Aiming to reduce the application of chemical products in the culture, the research for natural substances with antifungal action has been stimulated. In this work, the action of eight essential oils (rosemary, citronella, clove, copaíba, eucalyptus, mint, basil and tea tree) on *Colletotrichum gloeosporioides*, isolated from the sweet pepper fruits, was investigated. Initially, the *in vitro* activity of the essential oils on the fungus was evaluated by adding these oils to the potato-dextrose-agar (PDA) culture medium, in petri dishes, at following concentrations: 0.25%, 0.50% e 0.75%. The fungus was then transferred to the center of each petri dish containing the treatments. The experiment was conducted in a completely randomized design according to the 8x3 factorial scheme (eight essential oils x three concentrations), and one control treatment (composed of pure BDA), and three replicates. The experiment was conducted in duplicate. Plates were maintained at 22°C and 12 hour-photoperiod. To verify the effect of the essential oils, mycelial growth (diameter of colony), percentage of growth inhibition (PIC) and sporulation (number of spores / mL) were evaluated. In both trials, the essential oils of clove, citronella, eucalyptus, mint and basil, regardless of the concentration, totally inhibited the pathogen, not allowing the its sporulation. The second stage of this research aimed to study the action of the five pre-selected essential oils (clove, citronella, eucalyptus, mint and basil) on the sanitary and physiological quality of sweet pepper seeds infected by *Colletotrichum gloeosporioides*. For the seeds treatment, each essential oil was emulsified at 0.25% concentration in autoclaved water solution + Tween 80. The sanitary (blotter test) and the physiological quality (germination, seedling length, emergence, rate of emergency speed and dry mass). The essential oil of clove showed the best performance in the treatment of seeds, reducing efficiently the incidence of *C. gloeosporioides*, without harming the physiological quality of the sweet pepper seeds.

Keywords: Anthracnose, antifungal activity, *Capsicum annum*, natural substances.

SUMÁRIO

	Páginas
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	15
CAPÍTULO I - SENSIBILIDADE <i>IN VITRO</i> DE <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , ISOLADO DE PIMENTÃO, A ÓLEOS ESSENCIAIS.....	21
Resumo.....	23
Abstract.....	24
Introdução.....	25
Material e métodos.....	27
Resultados e discussão.....	30
Referência.....	39
CAPÍTULO II - ÓLEOS ESSENCIAIS NO TRATAMENTO DE SEMENTES DE PIMENTÃO INFECTADAS POR <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	45
Resumo.....	47
Abstract.....	47
Introdução.....	48
Material e métodos.....	49
Resultados e discussão.....	52
Literatura citada.....	56
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	59
REFERÊNCIAS.....	61

1. INTRODUÇÃO GERAL

As espécies do gênero *Capsicum*, pertencentes à família das Solanáceas, são conhecidas como pimentas e pimentões e têm como centro de origem regiões entre o sul do México e a América Central, incluindo as Antilhas (LAM-SANCHEZ, 1992). Estes frutos formam um grupo peculiar devido ao seu sabor e por estimularem também as funções digestivas, sendo que em torno de um quarto da população mundial os inclui em sua dieta (TEIXEIRA, 1996). As pimentas representam uma parte considerável do mercado de hortaliças frescas, atuando no segmento de temperos, condimentos e conservas (VALVERDE, 2011), enquanto que os pimentões possuem uma maior expressividade, seja no plantio como na comercialização e consumo, encontrando-se entre as dez hortaliças de maior importância econômica no mercado brasileiro (PEREIRA et al., 2001).

As doenças ocorrentes nas culturas podem ocasionar perdas significativas, uma vez que os frutos doentes são descartados e, quando na fase de plântula, causam tombamento e, conseqüentemente, morte da planta, resultando em falhas no estande, gerando assim um maior custo ao produtor devido ao replantio. Dentre as doenças que acometem o pimentão, destaca-se a antracnose que, em condições favoráveis ao desenvolvimento do fungo, como épocas chuvosas e áreas com alta concentração de inóculo, pode acarretar perdas de até 100% dos frutos (PAVAN et al., 2016). Anteriormente, o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (fase anamórfica *Glomerella cingulata*), era considerado o agente causal da antracnose do pimentão no Brasil (KUROZAWA et al., 2005), porém, sabe-se atualmente que ao menos cinco espécies do gênero *Colletotrichum* são responsáveis por esta doença (PAVAN et al., 2016). A caracterização fisiológica, baseando-se no desenvolvimento das colônias em diferentes temperaturas, utilização de fontes de carbono e, morfológica, através da forma e tamanho de apressórios e conídios (TOZZE JÚNIOR et al., 2006), tem auxiliado na diferenciação dos isolados, contudo, foram as técnicas moleculares que contribuíram significativamente na identificação das espécies, pois nem sempre os caracteres morfológicos são evidentes.

Em estudo com populações de *Colletotrichum* obtidas de pimentão, Bueno (2005) identificou, através da técnica de PCR ("*Polymerase chain reaction*"), 14 isolados como sendo *C. acutatum* e dois como *C. gloeosporioides*. Tozze Junior et. al. (2006) também demonstraram a associação dessas duas espécies à antracnose do pimentão, pimenta e jiló. Uma terceira espécie, *C. capsici*, foi identificada por Schurt et al. (2005) em sementes de pimentão. Posteriormente, Silva et al. (2007), em análise de isolados obtidos de pimentões e

pimentas do estado do Rio Grande do Sul, identificaram 28 isolados como *C. acutatum*, quatro como *C. gloeosporioides* e apenas um como *C. capsici*. Tozze Junior (2007), após caracterização e identificação através de análise por PCR de 56 isolados de *Colletotrichum* provenientes de pimentões de diferentes regiões produtoras, observou alta frequência da espécie *C. acutatum* nas principais regiões produtoras, a qual se apresentou como mais agressiva, principalmente em frutos verdes de pimentão. O autor também relatou, além das espécies já citadas acima, a presença de *C. coccodes* e *C. boninense* na cultura, sendo esta última relatada pela primeira vez infectando pimentão.

No Brasil, a antracnose é constatada em todas as regiões produtoras, atacando principalmente os frutos. O patógeno pode ser ainda transmitido pela semente (PAVAN et al., 2016), sendo esta uma fonte de inóculo responsável por sua introdução e disseminação em novas áreas. Nos frutos, ocorrem lesões de diâmetro variável, deprimidas e aquosas e, sob condições de alta umidade, observa-se, no centro destas lesões uma massa de conídios de coloração alaranjada ou rósea, denominada de cirro. Os conídios são produzidos nos acérvulos e liberados somente na presença de um filme de água, visto que uma substância mucilaginosa aglutina os conídios, inibindo sua germinação (REIS et al., 2009). Em ramos e folhas, os sintomas são pequenas lesões necróticas, geralmente alongadas. Quando presente na semente, o fungo causa "*damping off*" de pré e pós-emergência (PAVAN et al., 2016). Os sintomas observados nas sementes são caracterizados pela presença de massas mucilaginosas rosadas, que são os acérvulos.

As medidas para o controle da antracnose são: emprego de sementes saudáveis e tratadas; rotação de culturas com plantas não hospedeiras, evitando-se inclusive outras solanáceas; aplicação de fungicidas e proteção da cultura (plasticultura) em períodos chuvosos, além do manejo cultural de modo a evitar alta umidade, condição predisponente para o patógeno (PAVAN et al., 2016). Entretanto, o controle químico comumente adotado pelo produtor vem apresentando algumas adversidades. A primeira delas advém do fato de que o aparecimento de isolados de *Colletotrichum* resistentes aos fungicidas usualmente empregados tem aumentado, já tendo sido registrada resistência a azoxystrobin e thiabendazole (TORRES-CALZADA; TAPIA-TUSSEL, 2015). Haddad et al. (2003) salientam também que em condições ambientais favoráveis ao estabelecimento do patógeno (altas temperaturas associada a umidade elevada a chuvas frequentes), o controle químico mostra-se ineficiente. A segunda é devido ao último relatório liberado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, em que 90% das amostras de frutos de pimentão apresentaram irregularidades quanto à presença de agrotóxicos não

autorizados e/ou com concentrações de resíduos acima do estabelecido para a cultura, colocando o pimentão em primeiro lugar no ranking de alimentos com maiores níveis de contaminação por agrotóxico (ANVISA, 2014).

Tendo em vista a necessidade de se minimizar a aplicação de fungicidas, métodos alternativos têm sido propostos para controle da antracnose, como, por exemplo, a aplicação de *Pseudomonas fluorescens* em tratamento de sementes, que além de controlar a doença em frutos de pimenta, incrementou o crescimento e produtividade das plantas (RAJ et al., 2014); quitosana como indutor de resistência contra *C. capsici* em pimentão (EDIRISINGHE et al., 2014); emprego de extratos vegetais em frutos de pimentão, inibindo eficientemente o desenvolvimento da antracnose em condições controladas (ALVES et al., 2015). Juntamente com os extratos vegetais, os óleos essenciais têm demonstrado seu potencial no controle de diversas doenças.

Os óleos essenciais são substâncias complexas, constituídas por mono e sesquiterpenos, originados do metabolismo secundário da planta, e podem se apresentar como substitutos aos fungicidas sintéticos (DONNARUMMA et al., 2015). Essas substâncias podem atuar por ação fungitóxica direta, afetando a germinação dos esporos e desenvolvimento da colônia, e/ou indireta, através da indução de fitoalexinas, induzindo a planta à resistência (SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN, 2005). A presença dos extratos vegetais de nim, citronela, alho e gengibre, por exemplo, em meios de cultura contendo discos miceliais de *Curvularia eragrostitis*, agente causal da queima das folhas do inhame, reduziu a esporulação e germinação de conídios, assim como o desenvolvimento micelial (BRITO; NASCIMENTO, 2015). Plantas de soja infectadas por *Phakopsora pachyrhizi* e tratadas com o óleo essencial de tomilho apresentaram urediniósporos e urédias do fungo murchos, menores e em menor quantidade, evidenciando-se o efeito direto; contudo, nas plantas tratadas com os óleos essenciais de eucalipto, citronela e nim, não foram observadas alterações na morfologia dos urediniósporos, embora a incidência da doença tenha sido reduzida, sugerindo-se que o modo de atuação destes óleos esteja relacionado à indução de resistência na planta (MEDICE et al., 2007).

No que concerne ao *Colletotrichum*, existem, na literatura, relatos da eficiência dos óleos essenciais e extratos vegetais sobre espécies desse gênero. O óleo essencial de atroveran (*Ocimum selloi*) reduziu a germinação de esporos de *C. gloeosporioides* em 93% na concentração de 1.000 ppm (COSTA et al., 2015) e, os óleos essenciais de goiabeira

vermelha (*Psidium guayava* var. *pomifera*), alecrim-pimenta (*Lippia sidoides*), cidrão (*Lippia citriodora*), capim-santo (*Cymbopogon citratus*) e alfavaca-cravo (*Ocimum gratissimum*), nas concentrações entre 1 e 10 $\mu\text{L/mL}$, não possibilitam a germinação de esporos e desenvolvimento micelial desse mesmo patógeno (SOUZA JÚNIOR et al., 2009). Vivas et al. (2006) também relataram inibição devido ao uso do óleo essencial de capim-santo, mas para *C. acuntatum*, e em concentrações superiores a 100 $\mu\text{L/mL}$. Hossain et al. (2008) verificaram a ação antifúngica do óleo essencial de chá de java (*Orthosiphon stamineus*) na concentração mínima entre 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ sobre *C. capsici*. Avila-Sosa et al. (2011) relataram a eficácia de extratos vegetais de *Baccharis salicifolia*, orégano mexicano (*Lippia berlandieri*) e marigold mexicana (*Tagetes lucida*) na inibição do crescimento micelial de *C. gloeosporioides*. Sousa et al. (2012) obtiveram bons resultados com a utilização dos óleos essenciais de eucalipto, copaíba, andiroba, coco, nim, hortelã e pau rosa, na inibição do desenvolvimento micelial de isolados de *C. gloeosporioides* obtidos de fruto de pimenta, e Barbosa et al. (2015), demonstraram que os óleos essenciais de cravo, *tea tree* e palma rosa são eficientes no controle de *C. musae*, agente causal da antracnose na bananeira.

Apesar de inúmeros relatos da utilização desses produtos, a maioria dos estudos se concentra nas etapas iniciais, *in vitro*, e as pesquisas *in vivo* têm sua aplicabilidade direcionada aos frutos e folhas (MEDICE et al., 2007; GUÉDEZ et al., 2014; SEFU et al., 2015; ALVES et al., 2015). No caso dos óleos essenciais em tratamentos de sementes, Maraschin-Silva (2004) salienta que, dentre os fatores que interferem na germinação das sementes, destacam-se os oriundos do metabolismo secundário das plantas, que podem ser prejudiciais na captação de nutrientes, síntese de proteínas, assimilação de água, nos processos bioquímicos de germinação, entre outros. Esse é o fator limitante quando se trata da aplicação de óleos essenciais e extratos vegetais em tratamento de sementes.

Os óleos essenciais de candeia (*Eremanthus erythropappus*), palma rosa (*Cymbopogon martinii*) e alecrim (*Rosmarinus officinalis*) em tratamento sementes de soja, milho e feijão, a depender da concentração e tempo de exposição, podem ser fitotóxicos às mesmas, interferindo nos mecanismos fisiológicos e, conseqüentemente, impedindo a germinação (HILLEN et al., 2012). O óleo essencial de citronela (*Cymbopogon winterianus*), quando aplicado por meio da fumigação e impregnação em sementes de feijão caupi, afetou negativamente o vigor das sementes (XAVIER et al., 2012), assim como o emprego do óleo essencial de manjerição (*Ocimum minimum*) em tratamento de sementes de mandacaru, resultou em redução da germinação e velocidade de germinação a medida que se aumentava a

concentração do óleo essencial (BRITO et al., 2010). No entanto, os resultados variam de acordo com as espécies e os óleos essenciais empregados. O óleo essencial de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) a 0,5% em sementes de mandacaru, proporcionou um bom índice germinativo (96%) e maior velocidade de germinação, além do maior comprimento de plântulas em relação as sementes não tratadas (BRITO et al., 2010). Extratos de plantas e óleos essenciais apresentam divergências quanto à sua eficácia na aplicação em tratamento de sementes, contudo, visto a importância desses agentes na agricultura orgânica, torna-se essencial a realização de estudos que possibilitem sua utilização, de modo que seus benefícios sejam expressos sem afetar o vigor das sementes.

Nesse contexto, este trabalho foi desenvolvido com o intuito de avaliar a ação de óleos essenciais no tratamento de sementes de pimentão infectadas por *Colletotrichum gloeosporioides*, o que, além de se apresentar como uma medida de controle alternativa aos fungicidas usualmente empregados, evitaria a disseminação e introdução da doença em novas áreas.

Os objetivos específicos do estudo foram: a) verificar a ação antifúngica *in vitro* de oito óleos essenciais no crescimento micelial e esporulação do patógeno; b) verificar a ação dos óleos pré-selecionados no experimento *in vitro* no tratamento de sementes de pimentão infectadas por *C. gloeosporioides*, avaliando a qualidade sanitária e fisiológica das sementes tratadas. Para tanto, a dissertação foi dividida em dois capítulos: o primeiro intitulado "Sensibilidade *in vitro* de *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado do pimentão, a óleos essenciais", e redigido conforme as normas da Revista Brasileira de Plantas Medicinais; e o segundo intitulado "Óleos essenciais no tratamento de sementes de pimentão infectadas por *Colletotrichum gloeosporioides*", redigido conforme as normas da revista Ciências Agrárias.

CAPÍTULO I - Sensibilidade *in vitro* de *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado de pimentão, a óleos essenciais

Revista: Revista Brasileira de Plantas Mediciniais

Sensibilidade *in vitro* de *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado de pimentão, a óleos essenciais

NASCIMENTO, D. M.; SANTOS, P. L.; KRONKA, A. Z.

Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agronômicas (FCA),
Rua José Barbosa de Barros, nº 1780, 18.610-307, Botucatu, SP,
daniele_ocz@hotmail.com.

RESUMO: No presente estudo, foi avaliada a atividade *in vitro* dos óleos essenciais de alecrim, citronela, cravo da Índia, copaíba, eucalipto, hortelã, manjeriço e tea tree sobre o desenvolvimento de *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado de frutos de pimentão. Os óleos essenciais foram adicionados, nas concentrações 0,25%, 0,50% e 0,75%, ao meio de cultura batata-dextrose-água (BDA) contido em placas de Petri. Um disco de meio de cultura de 0,5 cm de diâmetro contendo o fungo foi transferido para o centro de cada placa de Petri contendo os tratamentos. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, segundo o esquema fatorial 8x3 (oito óleos essenciais x três concentrações), e um tratamento testemunha, composto apenas pelo meio de cultura BDA. Foram utilizadas três repetições por tratamento, cada repetição representada por uma placa de Petri. O experimento foi conduzido em duplicata. As placas foram mantidas a 22°C e fotoperíodo de 12 horas. Para verificar o efeito dos óleos essenciais, o crescimento micelial (diâmetro das colônias) e a esporulação (número de esporos/mL) foram determinados. Também foi determinada a porcentagem de inibição do crescimento em relação à testemunha. Nos dois ensaios, os óleos essenciais de cravo, citronela, eucalipto, hortelã e manjeriço, independente da concentração empregada, inibiram totalmente o patógeno. Este efeito também foi observado para os óleos essenciais de alecrim, a 0,75%, e tea tree,

a 0,50% e 0,75%. O óleo essencial de copaíba permitiu desenvolvimento fúngico nas três concentrações, nos dois ensaios. Com exceção do óleo essencial de copaíba, os demais apresentaram atividade antifúngica sobre *C. gloeosporioides*, com potencial de uso no manejo deste fungo.

Palavras-chave: Antracnose, ação antifúngica, *Capsicum annum*, controle alternativo.

ABSTRACT: Sensitivity *in vitro* of *Colletotrichum gloeosporioides*, isolated from sweet peppers, to essential oils. In the present study, the effect of essential oils of rosemary, citronella, out in a completely randomized design in a factorial scheme 8x3 (8 essential oils x 3 concentrations cloves, copaiba, eucalyptus, mint, basil and tea tree on the *in vitro* development of *Colletotrichum gloeosporioides*, isolated from sweet pepper fruits, was evaluated. The essential oils were added to potato-dextrose -agar medium (PDA) in the following concentrations: 0,25%, 0,50% and 0,75%. A disc of 0.5 cm diameter of PDA medium with the fungus was placed in the center of each petri dish containing the treatments. The experiment was carried) and one control treatment, consisted of only PDA. Three replications were employed, each one represented by a petri dish. The experiment was performed in duplicate. The plates were maintained at 22 °C and 12 hour-photoperiod. To evaluate the inhibitory effect of the oils, mycelial growth (diameter of colony) and sporulation (number of spores/mL) for each treatment were determined. The percentage of growth inhibition of each essential oil related to the control treatment was also calculated. In both experiments, essential oils of clove, citronella, eucalyptus, mint and basil inhibited mycelial growth and sporulation completely, in all concentrations. This effect was also observed by rosemary (0,75%) and tea tree (0,50% e 0,75%) essential oils. Copaiba essential oil allowed the fungus

development in all concentrations, in both experiments. Except for copaiba essential oils, the others had antifungal activity to *C. gloeosporioides*, showing potential of use for this fungus management.

Key words: Anthracnose, Antifungal activity, *Capsicum annum*, alternative control, plant compounds.

INTRODUÇÃO

O surgimento de patógenos fúngicos resistentes aos produtos químicos usualmente empregados pelos produtores tem se tornado um sério problema no manejo de doenças em plantas. Uma das hortaliças mais consumidas no Brasil, o pimentão tem seus frutos severamente afetados pela antracnose, causada por espécies do gênero *Colletotrichum*, cujos isolados já se mostraram resistentes a alguns princípios químicos, como azoxystrobin e thiabendazole (Torres-Calzada & Tapia-Tussel, 2015). Em condições favoráveis ao desenvolvimento da doença (épocas chuvosas e áreas com alta concentração de inóculo), as perdas podem chegar a 100% dos frutos em pouco tempo (Pavan et al., 2016). Além do mais, é uma das culturas que mais apresentam irregularidades quanto à presença de agrotóxicos não registrados ou em concentrações superiores ao estabelecido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2014).

Esses dois fatores, resistência e presença de resíduos químicos nos frutos, prejudiciais à saúde humana, têm levado à busca de produtos alternativos que possam combater este patógeno (Alves et al., 2015). Nesse sentido, tem-se

pesquisado o uso de óleos essenciais, que são substâncias complexas oriundas do metabolismo secundário das plantas, constituídas por mono e sesquiterpenos (Donnaruma et al., 2015). A vantagem que estas substâncias apresentam sobre os fungicidas, e que possibilita sua adoção sem o risco de os fungos adquirirem resistência, é o fato de serem formados por diversos compostos vegetais, os quais não podem ser inativados pelos patógenos; agem de maneira seletiva, no entanto, possuem múltiplos modos de ação, além de serem menos agressivos ao meio ambiente, sofrendo a biodegradação (Ferraz & Freitas, 2004).

Os óleos essenciais, por causarem alterações morfológicas nos micélios fúngicos, como a desorganização dos conteúdos celulares, acentuada fragmentação e menor turgência das hifas, formação de vacúolos e diminuição na nitidez da parede celular (Costa et al., 2011), interferem negativamente no desenvolvimento dos fungos. Através de observações em microscópio óptico, constataram-se alterações morfológicas em hifas de espécies de *Aspergillus* pelo óleo essencial de capim limão (*Cymbopogon citratus*) (Sulaiman, 2013). Discos miceliais de *Colletotrichum musae* postos em meios de cultura contendo os óleos essenciais de *tea tree*, palma-rosa e cravo, não se desenvolveram, demonstrando a toxicidade destes óleos ao patógeno (Barbosa et al., 2015). Visto a grande diversidade de plantas no Brasil, pesquisas são necessárias a fim de selecionar as que possuem ação fungicida sobre determinados patógenos.

Diante do exposto, e considerando-se a necessidade da eventual substituição dos produtos químicos por produtos com compostos vegetais, objetivou-se avaliar a ação *in vitro* de óleos essenciais sobre o desenvolvimento de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causal da antracnose no pimentão.

MATERIAL E MÉTODOS

O ensaio foi desenvolvido no Departamento de Proteção Vegetal da Faculdade de Ciências Agronômicas (FCA), UNESP/Câmpus de Botucatu, SP. Foram utilizados oito óleos essenciais, adquiridos de empresa comercial. A relação de seus nomes populares e científicos, famílias botânicas pertencentes e botânico responsável pela identificação taxonômica, assim como seus respectivos compostos majoritários, segundo análise emitida pela empresa, encontram-se descritos na Tabela 1.

TABELA 1. Óleos essenciais empregados e seus respectivos compostos majoritários.

Óleo essencial	Composto majoritário
Alecrim (<i>Rosmarinus officinalis</i> L. <i>Labiatae</i> - Família Lamiaceae)	β -mirceno (23,5%) 1,8 cineol (22%) α -pineno (20%)
Citronela (<i>Cymbopogon winterianus</i> Jowitt - Família Poaceae)	Geraniol (41%) Citronelal (29%) Citronelol (13%)
Cravo da Índia (<i>Syzygium aromaticum</i> (L.) Merr. & L. M. Pery - Família Myrtaceae)	Eugenol (81%)
Copaíba (<i>Copaifera langsdorfii</i> Desf. - Família Fabaceae)	β -cariofileno (45%)
Eucalipto (<i>Eucalyptus citriodora</i> Hook - Família Myrtaceae)	Citronelal (75%)
Hortelã (<i>Mentha arvensis</i> L. - Família Lamiaceae)	Mentol (52,50%)
Manjericão (<i>Ocimum basilicum</i> L. - Família Lamiaceae)	Metil chavicol (74,15%) Linalol (17,60%)
Tea tree (<i>Melaleuca alternifolia</i> Cheel - Família Myrtaceae)	Terpinen-4-ol (32,60%) Y-terpineno (19,80%) Terpinoleno (3,55%)

O fungo foi isolado de lesões características de antracnose presentes em frutos de pimentão, através do isolamento direto, que consiste na transferência de esporos do patógeno, utilizando-se um estilete flambado, para uma placa de Petri contendo meio de cultura agarizado. Após seu crescimento, o fungo foi repicado novamente, a

fim de se obter uma cultura pura, que originou os discos miceliais utilizados no experimento.

Efeito dos óleos essenciais no crescimento micelial de *C. gloeosporioides*

Os óleos essenciais foram adicionados ao meio de cultura batata dextrose ágar (BDA) no momento deste ser vertido em placas de Petri, nas concentrações de 0,25%, 0,5% e 0,75%, definidas com base em testes preliminares. Após a solidificação do meio, foi transferido para o centro de cada uma das placas, um disco de 0,5 cm de diâmetro colonizado pelo patógeno. As placas foram mantidas em BOD a 25 °C com fotoperíodo de 12 h, avaliando-se, diariamente, o diâmetro das colônias, através da medição, com o auxílio de paquímetro digital, de duas posições perpendiculares entre si, e considerando-se o valor médio destas. As avaliações de crescimento foram realizadas até que todas as repetições de um dos tratamentos atingissem a borda da placa de Petri, representando, assim, o crescimento máximo. Com os dados da última avaliação, calculou-se a porcentagem de inibição do crescimento (PIC) dos tratamentos em relação a testemunha, utilizando-se a fórmula:

$$PIC = \frac{(\text{Diâmetro da testemunha} - \text{Diâmetro do tratamento})}{(\text{Diâmetro da testemunha})} \times 100$$

Os dados de crescimento micelial diários foram também utilizados na elaboração de um gráfico de regressão. O modelo escolhido para plotar o gráfico foi o que apresentou maior R².

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 8 x 3 (oito óleos essenciais x três concentrações) e uma testemunha, composta apenas pelo meio BDA sem a adição de óleos essenciais, com

três repetições (considerando-se cada placa de Petri uma repetição). O experimento foi realizado em duplicata (Ensaio I e II).

Efeito dos óleos essenciais na esporulação de *C. gloeosporioides*

Para a avaliação de esporulação, foram retirados de cada placa, três discos de micélio de 0,5 cm, transferindo-os para recipientes plásticos contendo 5 mL de água destilada com espalhante adesivo Tween 80 (uma gota em 100 mL de água). Estes recipientes foram agitados durante três minutos, obtendo-se uma suspensão de conídios para a leitura da esporulação. A concentração dos conídios foi determinada através de leitura em hemocitômetro (câmara de Neubauer), realizando-se quatro leituras (cada qual correspondente a um quadrante) por repetição, e considerando-se o valor médio destas.

Análise estatística dos resultados

Os resultados da avaliação de crescimento micelial foram expressos em centímetros, e submetidos à análise de variância pelo teste F, sendo as médias da testemunha e do fatorial comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os dados de esporulação foram transformados para $\log x$ e submetidos à análise de variância pelo teste F, sendo as médias da testemunha e do fatorial comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para cada experimento, a média de cada tratamento foi comparado com a média da testemunha pelo teste de Dunnet a 5% de probabilidade (Banzatto & Kronka, 2006).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve interação significativa entre óleos essenciais e concentrações em todos os ensaios. Os resultados do crescimento micelial e de porcentagem de inibição do crescimento (PIC) dos dois ensaios encontram-se na Tabela 2. Com exceção dos óleos essenciais de alecrim e copaíba, ambos a 0,25%, no primeiro ensaio, todos os demais tratamentos diferiram da testemunha, pelo teste de Dunnett, promovendo uma diminuição no crescimento micelial.

TABELA 2. Crescimento micelial e porcentagem de inibição de crescimento de *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado de pimentão, cultivado em meio de cultura BDA e BDA acrescido de óleos essenciais em diferentes concentrações.

TRATAMENTOS		ENSAIO 1		ENSAIO 2	
		Crescimento micelial (cm)	PIC (%)	Crescimento micelial (cm)	PIC (%)
Alecrim	0,25%	8,3 a A	2,12	4,3 a A*	49,14
	0,50%	2,6 b B*	70,00	0,0 b B*	100,00
	0,75%	0,0 b C*	100,00	0,0 b B*	100,00
Cravo	0,25%	0,0 c A*	100,00	0,0 c A*	100,00
	0,50%	0,0 b A*	100,00	0,0 b A*	100,00
	0,75%	0,0 b A*	100,00	0,0 b A*	100,00
Copaíba	0,25%	6,0 ab A	29,88	4,9 a A*	42,24
	0,50%	5,9 a A*	30,20	4,7 a AB*	45,14
	0,75%	5,2 a A*	39,37	4,3 a B*	49,14
Citronela	0,25%	0,0 c A*	100,00	0,0 c A*	100,00
	0,50%	0,0 b A*	100,00	0,0 b A*	100,00
	0,75%	0,0 b A*	100,00	0,0 b A*	100,00
Eucalipto	0,25%	0,0 c A*	100,00	0,0 c A*	100,00
	0,50%	0,0 b A*	100,00	0,0 b A*	100,00
	0,75%	0,0 b A*	100,00	0,0 b A*	100,00
Hortelã	0,25%	0,0 c A*	100,00	0,0 c A*	100,00
	0,50%	0,0 b A*	100,00	0,0 b A*	100,00
	0,75%	0,0 b A*	100,00	0,0 b A*	100,00
Manjeriçã	0,25%	0,0 c A*	100,00	0,0 c A*	100,00
	0,50%	0,0 b A*	100,00	0,0 b A*	100,00
	0,75%	0,0 b A*	100,00	0,0 b A*	100,00
<i>Tea tree</i>	0,25%	4,5 b A*	47,41	2,5 b A*	70,16
	0,50%	0,0 b B*	100,00	0,0 b B*	100,00
	0,75%	0,0 b B*	100,00	0,0 b B*	100,00
BDA		8,5	-	8,5	-

Para o crescimento micelial, em cada ensaio:

a, b, c - em cada nível de concentração, médias de óleos essenciais seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P>0,05$).

A, B - em cada nível de óleo essencial, médias de concentrações seguidas de mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P>0,05$).

* Cada tratamento diferiu da testemunha (BDA) pelo teste de Dunnett ($P<0,01$).

Os óleos essenciais de cravo, citronela, eucalipto, hortelã e manjeriçã não possibilitaram o desenvolvimento fúngico em nenhuma das concentrações testadas, sendo considerado eficazes no controle *in vitro* do patógeno.

Concentrações superiores a 0,25% do óleo essencial de *tea tree* inibiram totalmente o crescimento micelial, o mesmo sendo observado com o óleo essencial

de alecrim a 0,75%. Para este último óleo, o desenvolvimento da colônia diminuiu à medida que se aumentou a concentração, onde, a 0,25%, observou-se uma inibição de crescimento de 2,12% e 49,14%, respectivamente, nos ensaios I e II, elevando esta porcentagem de inibição para 70% e 100% para as concentrações maiores.

Em relação ao óleo essencial de copaíba, o PIC variou de 29,88% e 42,24%, a 0,25%, para 39,37% e 49,15%, a 0,75%, nos ensaios I e II, respectivamente, contudo, o crescimento micelial não diferiu significativamente nas três concentrações no primeiro ensaio e, no segundo, o crescimento a 0,25% foi significativamente superior que a 0,75%, não havendo diferença estatística entre a concentração 0,50% e as demais.

Na Tabela 3 estão dispostos os dados referentes à esporulação. Para os óleos que inibiram totalmente o desenvolvimento fúngico não houve esporulação. Para o óleo essencial de copaíba, não ocorreu diferença significativa na esporulação, nas três concentrações, nos dois ensaios. Na concentração de 0,25%, a esporulação do tratamento contendo o óleo essencial de *tea tree* não diferiu significativamente do de copaíba, e ambos diferiram do alecrim, o qual apresentou a menor esporulação.

TABELA 3. Esporulação de *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado de pimentão, cultivado em meio de cultura BDA e BDA acrescido de óleos essenciais em diferentes concentrações.

TRATAMENTOS		ENSAIO 1		ENSAIO 2	
		Esporulação		Esporulação	
		log (x+1) ¹	Nº esporos/mL ²	log (x+1) ¹	Nº esporos/mL ²
Alecrim	0,25%	1,32 bc A*	0,08 x10 ⁴	1,39 b A*	0,50 x10 ⁴
	0,50%	1,23 b A*	0,17 x10 ⁴	0,00 b B*	0
	0,75%	0,00 b A*	0	0,00 b B*	0
Cravo	0,25%	0,00 c A*	0	0,00 b A*	0
	0,50%	0,00 b A*	0	0,00 b A*	0
	0,75%	0,00 b A*	0	0,00 b A*	0
Copaíba	0,25%	3,60 a A	0,50 x10 ⁴	4,94 a A*	37,25 x10 ⁴
	0,50%	3,70 a A	0,50 x10 ⁴	4,23 a A	2,25 x10 ⁴
	0,75%	4,65 a A	48,91 x10 ⁴	4,59 a A*	36,25 x10 ⁴
Citronela	0,25%	0,00 c A*	0	0,00 b A*	0
	0,50%	0,00 b A*	0	0,00 b A*	0
	0,75%	0,00 b A*	0	0,00 b A*	0
Eucalipto	0,25%	0,00 c A*	0	0,00 b A*	0
	0,50%	0,00 b A*	0	0,00 b A*	0
	0,75%	0,00 b A*	0	0,00 b A*	0
Hortelã	0,25%	0,00 c A*	0	0,00 b A*	0
	0,50%	0,00 b A*	0	0,00 b A*	0
	0,75%	0,00 b A*	0	0,00 b A*	0
Manjeriçã	0,25%	0,00 c A*	0	0,00 b A*	0
	0,50%	0,00 b A*	0	0,00 b A*	0
	0,75%	0,00 b A*	0	0,00 b A*	0
Tea tree	0,25%	3,10 ab A*	9,17 x10 ⁴	4,11 a A*	1,75 x10 ⁴
	0,50%	0,00 b A*	0	0,00 b B*	0
	0,75%	0,00 b A*	0	0,00 b B*	0
BDA		5,93	87,91 x10 ⁴	5,92	91,00 x10 ⁴

Para cada ensaio, na coluna:

¹ Dados transformados; ² Dados originais

a, b, c - em cada nível de concentração, médias de óleos essenciais seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).

A, B - em cada nível de óleo essencial, médias de concentrações seguidas de mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).

* Cada tratamento diferiu da testemunha (BDA) pelo teste de Dunnett (P<0,01).

Como demonstrado, o óleo essencial de alecrim foi eficaz nas concentrações 0,50% e 0,75%. Roswalka et al. (2008) obtiveram sucesso no controle *in vitro* de *C. gloeosporioides* e sua forma sexuada, *Glomerella cingulata*, com este óleo essencial. Contudo, estes autores optaram pela metodologia de aplicação do óleo a placa de

Petri através da distribuição de alíquotas do mesmo em três pontos equidistantes da placa. Em concentrações variando entre 500 e 2000 µg/mL, este óleo demonstrou ser ineficaz no controle *in vitro* de *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *A. ochraceus* e *Fusarium* sp. (Pereira et al., 2006).

A ação inibitória do óleo essencial de cravo já foi relatada para outros patógenos, como *Rhizopus stolonifer* e *Fusarium solani* (Sameza et al., 2016). Em estudo com *C. gloeosporioides* e sua forma sexuada, *Glomerella cingulata*, Roswalka et al. (2008) também constataram 100% de inibição no desenvolvimento com este óleo essencial. O teor do composto majoritário encontrado neste óleo, o eugenol (81%), está de acordo com o descrito por Sameza et al. (2016), que verificaram 79,4%.

Os resultados obtidos corroboram com os de Sousa et al. (2012), que relataram inibição do crescimento micelial de *C. gloeosporioides* pelo óleo essencial de copaíba, com o diâmetro da colônia variando entre 6,36 cm a 0,20% do óleo e 4,54 cm a 1%. No presente estudo, em ambos os experimentos, estes valores variaram entre 6,0 e 4,9 cm a 0,25% e 5,2 e 4,3 cm a 0,75%. Silva et al. (2009) verificaram inibição total de *C. gloeosporioides* por este óleo, porém, os autores optaram por outra metodologia, distribuindo-se 100 µL dessa substância na superfície da placa de Petri, antes da adição do disco fúngico, o que talvez tenha levado a um maior contato do óleo com o fungo, tornando-o mais letal. Araújo Neto et al. (2014) também encontraram uma correlação positiva entre concentração e porcentagem de inibição, sendo que a 0,5% mL/L do óleo essencial de copaíba, a redução na área da colônia, em relação ao tratamento testemunha, foi em torno de 80%, passando a 88,9% na concentração de 2,0 mL/L.

Apesar do óleo essencial de copaíba não proporcionar resultados satisfatórios no controle *in vitro*, ressalta-se que seu emprego para os demais patossistemas não pode ser descartado. Mondego et al. (2014), em trabalho com sementes de *Pseudobombax marginatum*, relatam que a concentração de 1,5% do óleo controlou eficientemente os fungos *Aspergillus* sp., *Chaetomium* sp. e *Curvularia* sp., sem afetar a qualidade fisiológica das sementes tratadas.

Sarmiento-Brum et al. (2013) observaram que a 0,25 µL/mL do óleo essencial de citronela, o início do desenvolvimento de *C. graminicola*, agente causal da antracnose do sorgo, se deu a partir do segundo dia de incubação, e a partir do terceiro a 0,50 µL mL⁻¹. Acima de 0,75 µL mL⁻¹ já não ocorreu mais desenvolvimento da colônia. Para *C. gloeosporioides*, como visto, as três concentrações estudadas controlaram o patógeno ao decorrer do período de incubação.

Os principais compostos majoritários amostrados no óleo de citronela usado neste trabalho foram o geraniol (41%), citronelal (29%) e citronelol (13%). A presença do geraniol como principal constituinte, seguido por citronelal e citronelol, foi verificada por Quintans-Júnior et al. (2008), que encontraram estes três compostos nas porcentagens de 40,6%, 27,44% e 10,45%, demonstrando que a análise química do óleo essencial de citronela empregado está de acordo com a literatura.

Segundo Sousa et al. (2012), doses crescentes do óleo essencial de eucalipto (*Eucalyptus* spp.) foram mais eficientes na inibição de *C. gloeosporioides*, sendo que a 0,20%, o diâmetro da colônia (8,52 cm) não diferiu da testemunha e, a 1%, não ocorreu crescimento. Como verificado nesse trabalho, a partir de 0,25% do óleo essencial de eucalipto citriodora, o fungo já foi incapaz de se desenvolver no meio.

Empregando o óleo essencial de hortelã (*Mentha* sp.), Sousa et al. (2012) constataram que em concentrações superiores a 0,40%, a inibição de *C. gloeosporioides* foi de 100%. No isolado utilizado neste estudo, a 0,25% já se obteve 100% de inibição.

Nas três concentrações testadas, o óleo essencial de manjeriço inibiu totalmente o desenvolvimento do patógeno. A partir de 1000 µL/L deste óleo, Thomidis e Filotheou (2016) relatam inibição total de *Pilidiella granati*. A concentração máxima estudada por Marandi et al. (2011), de 500 µL/L, inibiu em 24,66% e 61,66% o crescimento micelial de *Botrytis cinerea* e *Penicillium expansum*, respectivamente. Estes autores observaram também que a porcentagem de inibição é proporcional ao aumento das concentrações. Esta relação evidenciou-se em estudo de Elsherbiny et al. (2016) com espécies de *Bipolaris* e *Cochliobolus*, empregando-se concentrações entre 10 e 80 mg/mL do óleo essencial de manjeriço e, obtendo 100% de inibição das seis espécies trabalhadas a 80 mg/mL. Para outros patógenos, como *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *A. ochraceus*, *Fusarium* sp. (Pereira et al., 2006), e *Macrophomina phaseolina* (Khaledil et al., 2015), o óleo essencial de manjeriço foi ineficaz. No entanto, há relatos de sucesso no controle *in vitro* de *Rhizoctonia solani* (Khaledi et al., 2015)

O metil chavicol (74,15%) foi o principal composto encontrado no óleo essencial de manjeriço utilizado nesta pesquisa, sendo o linalol (17,60%), o composto secundário, diferindo do relatado por Thomidis e Filotheou (2016) e Marandi et al. (2011), que obtiveram como composto majoritário o linalol, com teor de 34,9 e 65,25%, respectivamente, e não detectaram o metil chavicol. Contudo, em estudo com espécies de *Ocimum* ocorrentes no Brasil, Oliveira et al. (2013) verificaram teores em torno de 36-41% de metil chavicol e 29-32% de linalol.

A atividade fungicida do óleo essencial de *tea tree* já foi relatada para *Colletotrichum musae* a partir de 50 µL/L. Para *C. gloeosporioides*, no presente estudo, foram necessárias concentrações superiores a 0,50%. O crescimento micelial de *Fusarium graminearum*, *F. culmorum* e *Pyrenophora graminea* foi afetado em concentrações variando de 0,25 a 5%, segundo observado por Terzi et al. (2007). Yu et al. (2015) relatam que o terpinen-4-ol ocasiona alterações na morfologia micelial, na permeabilidade da membrana e no conteúdo de ergosterol dos fungos.

Enquanto os tratamentos contendo o óleo essencial de copaíba possibilitaram o crescimento fúngico desde o primeiro dia de incubação, nas três concentrações estudadas (Figura 1), verifica-se que, com o óleo essencial de alecrim, a 0,25%, o crescimento se deu a partir do segundo e terceiro dia, nos ensaios I e II, respectivamente, e, a 0,50%, no quinto e sétimo dia (Figura 2). Esses dados demonstram que esse óleo essencial possui a capacidade de inibir o fungo por um dado período de tempo e, com o aumento da concentração, há também um prolongamento nesse período.

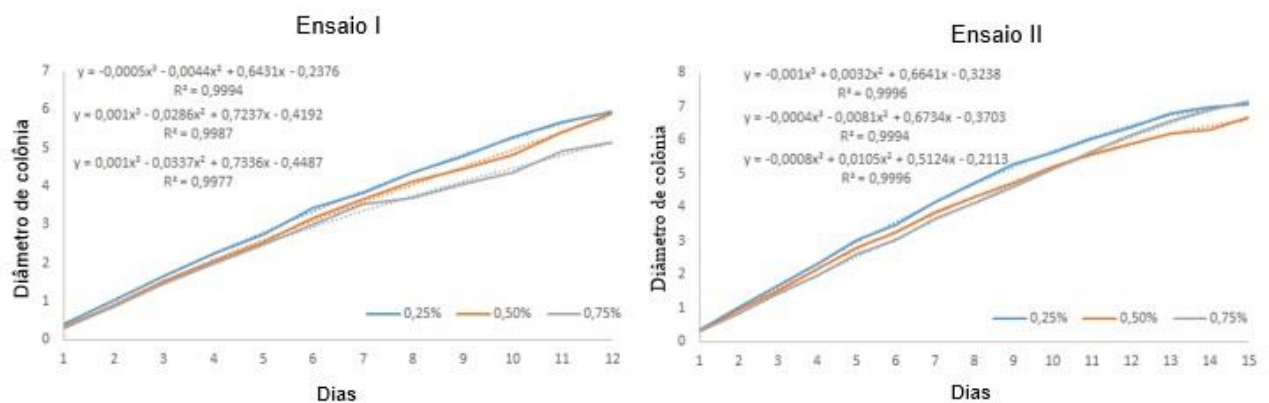


FIGURA 1. Crescimento de *Colletotrichum gloeosporioides* na presença do óleo essencial de copaíba durante 12 (Ensaio I) e 15 dias (Ensaio II).

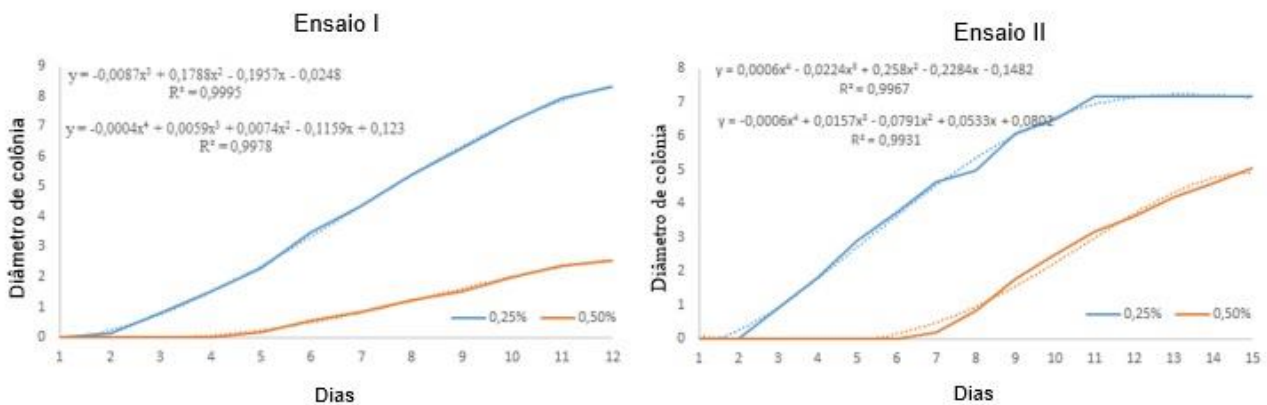


FIGURA 2. Crescimento de *Colletotrichum gloeosporioides* na presença do óleo essencial de alecrim durante 12 (Ensaio I) e 15 dias (Ensaio II).

O óleo essencial de *tea tree* a 0,25% controlou o patógeno *in vitro* nos três primeiros dias, em ambos os ensaios (Figura 3). Barbosa et al. (2015) verificaram que, ao empregarem esse mesmo óleo essencial no controle *in vitro* de *Colletotrichum musae*, em concentrações variando de 25 a 125 $\mu\text{L/L}$, o fungo iniciou seu desenvolvimento na menor concentração a partir de 72h de incubação, e na concentração seguinte, de 50 $\mu\text{L/L}$, a partir de 168 h de incubação.

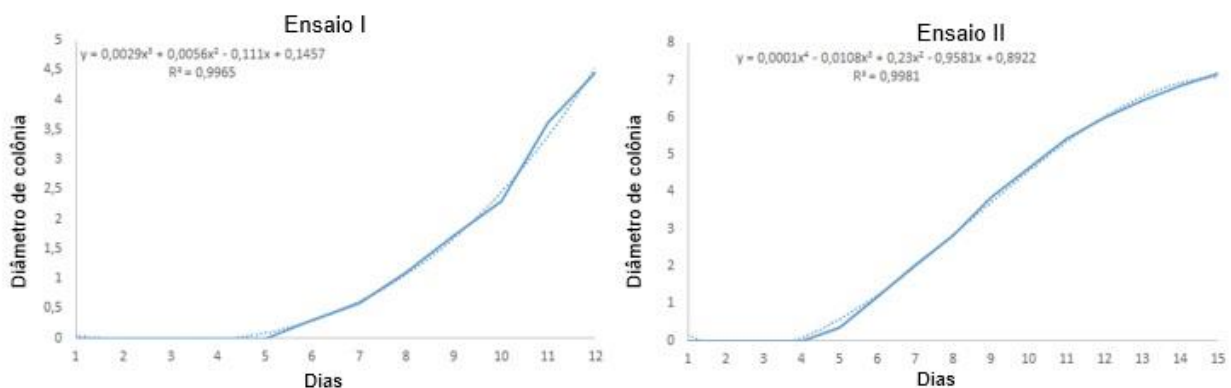


FIGURA 3. Crescimento de *Colletotrichum gloeosporioides* na presença do óleo essencial de *tea tree* durante 12 (Ensaio I) e 15 dias (Ensaio II).

Segundo Simões e Spitezer (2000) e Rozwalka et al. (2008), a volatilização dos constituintes dos óleos assim como sua instabilidade na presença da luz, calor e umidade, modificam a atmosfera no interior das placas de Petri, levando à perda da eficácia de um óleo que, inicialmente, conteve o desenvolvimento fúngico, corroborando com Khalili et al. (2015), que ressaltam a formação dos óleos por compostos voláteis e sua subsequente degradação a temperatura ambiente. De acordo com esses autores e, como demonstrado no presente estudo, espera-se que após a evaporação dos óleos essenciais, os patógenos retomem seu crescimento, contudo, maiores concentrações demandam mais dias para total evaporação e, por este motivo, também controlam o fungo por um maior período.

Com base nesses resultados, os óleos essenciais de cravo, citronela, eucalipto, hortelã e manjeriço demonstraram atividade fungicida contra *Colletotrichum gloeosporioides* nas três concentrações estudadas, inibindo-o totalmente. Alecrim e *tea tree* inibiram em 100% o desenvolvimento fúngico somente quando empregadas concentrações superiores a 0,50% e 0,25%, enquanto que o óleo essencial de copaíba possibilitou que o patógeno se desenvolvesse, independente da concentração. Com exceção do óleo essencial de copaíba, os demais são sugeridos para estudos posteriores, afim de se comprovar a ação dos mesmos *in vivo*, quando aplicados em frutos ou sementes acometidas pela antracnose.

REFERÊNCIA

ALVES, K.F. et al. Efficacy of plant extracts for anthracnose control in bell pepper fruits under controlled conditions. **Horticultura Brasileira**, v.33, n.3, p.332-338, 2015.

ARAÚJO NETO, S.E. et al. Controle pós-colheita da antracnose do maracujazeiro-amarelo com aplicação de óleo de copaíba. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.36, n.2, p.509-514, 2014.

ANVISA. **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em alimentos (PARA)**, 2014. Disponível em:

<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/d67107004634368583a5bfec1b28f937/Relat%C3%B3rio+PARA+2012+2%C2%AA+Etapa+++17_10_14-Final.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 01 dez. 2016.

BARBOSA, M.S. et al. Atividade biológica *in vitro* de própolis e óleos essenciais sobre o fungo *Colletotrichum musae* isolado de bananeira (*Musa* spp.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 2, p. 254-261, 2015.

COSTA, A.R.T. et al. Ação do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L. M. Perry sobre as hifas de alguns fungos fitopatogênicos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.13, n.2, p.240-245, 2011.

DONNARUMMA. L. et al. Use of essential oil in control strategies against *Zucchini* powdery mildew. **Journal of Phytopathology**, v. 163, n.11-12, 877-885, 2015.

ELSHARBINY, E.A. et al. Chemical composition and fungicidal effects of *Ocimum basilicum* essential oil on *Bipolaris* and *Cochliobolus* species. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v.18, n.1, p.1143-1152, 2016.

FERRAZ S.; FREITAS L. G. **O controle de fitonematóides por plantas antagonistas e produtos naturais**. 2004. Disponível em <https://www.researchgate.net/publication/255617363_O_CONTROLE_DE_FITONE

MATOIDES_POR_PLANTAS_ANTAGONISTAS_E_PRODUTOS_NATURAIS>.

Acesso em: 01 dez. 2016.

KHALEDI, N. et al. Antifungal activity of various essential oils against *Rhizoctonia solani* and *Macrophomina phaseolina* as major bean pathogens. **Journal of Applied Microbiology**, v.118, n.1, p.704-717, 2014.

KHALILI, S.T. et al. Encapsulation of Thyme essential oil in chitosan-benzoic acid nanogel with enhanced antimicrobial activity against *Aspergillus flavus*. **Food Science and Technology**, v.60, n.1, p.502-508, 2015.

MARANDI, R.J. et al. Control of *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* on pear with *Thymus kotschyanus*, *Ocimum basilicum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. **Journal of Medicinal Plants Research**, v.5, n.4, p.626-634, 2011.

MONDEGO, J.M. et al. Controle alternativo da microflora de sementes de *Pseudobombax marginatum* com óleo essencial de copaíba (*Copaifera* sp.). **Bioscience Journal**, v.30, n.2, p.349-355, 2014.

OLIVEIRA, R.A. et al. Linalool and methyl chavicol present basil (*Ocimum* sp.) cultivated in Brazil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.15, n.2, p.309-311, 2013.

KHALILI, S.T. et al. Encapsulation of Thyme essential oil in chitosan-benzoic acid nanogel with enhanced antimicrobial activity against *Aspergillus flavus*. **Food Science and Technology**, v.60, n.1, p.502-508, 2015.

PAVAN, M.A.; KRAUSE-SAKATE, R.; MOURA, M.F; KUROZAWA, C. Doenças das solanáceas. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO,

L. E. A. **Manual de Fitopatologia**: Doenças das plantas cultivadas. 5 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2016., v.2, cap.68, p.677-686.

PEREIRA, M.C. et al. Inibição do desenvolvimento fúngico através da utilização de óleos essenciais de condimentos. **Ciência e Agrotecnologia**, v.30, n.4, p.731-738, 2006.

QUINTANS-JÚNIOR, L.J. et al. Phytochemical screening and anticonvulsant activity of *Cymbopogon winterianus* Jowitt (Poaceae) leaf essential oil in rodents. **Phytomedicine**, v. 15, n.8, p. 619-624, 2008.

ROZWALKA, L.C. et al. Extratos, decoctos e óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas na inibição de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides* de frutos de goiaba. **Ciência Rural**, v.38, n.2, p.301-307, 2008.

SAMEZA, M.L. et al. Evaluation of clove essential oil as a mycobiocide against *Rhizopus stolonifer* and *Fusarium solani*, tuber rot causing fungi in Yam (*Dioscorea rootundata* Poir.). **Journal of Phytopathology**, v.1, n.164, p.433-440, 2016.

SARMENTO-BRUM, R.B.C. et al. Efeito de óleos essenciais de plantas medicinais sobre a antracnose do sorgo. **Bioscience Journal**, v.29, suplemento 1, p.1549-1557, 2013.

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

SIMÕES, C.M.O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2000. Cap.18.

SOUSA, R.M.S. et al. Efeito de óleos essenciais como alternativa no controle de *Colletotrichum gloeosporioides*, em pimenta. **Summa Phytopathologica**, v.38, n.1, p.42-47, 2012.

SULAIMAN, A. A. Y. Antifungal activity of volatiles from Lemongrass (*Cymbopogon citratus*) and Peppermint (*Mentha piperita*) oils against some respiratory pathogenic species of *Aspergillus*. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v.2, n.1, p.261-272, 2013.

TERZI, V et al. *In vitro* antifungal activity of the tea tree (*Melaleuca alternifolia*) essential oil and its major components against plant pathogens. **Letters in Applied Microbiology**, v.1, n.44, p.613-618, 2007.

THOMIDIS, T.; FILOTHEOU, A. Evaluation of five essential oils as bio-fungicides on the control of *Pilidiella granati* rot in pomegranate. **Crop Protection**, v.1, n.89, p.66-71, 2016.

TORRES-CALZADA, C.; TAPIA-TUSSEL, R. Sensitivity of *Colletotrichum truncatum* to four fungicides and characterization of thiabendazole-resistant isolates. **Plant Disease**, v. 99, n. 11, p.1590-1595, 2015.

YU, D. et al. Antifungal modes of action of tea tree oil and its two characteristic components against *Botrytis cinerea*. **Journal of Applied Microbiology**, v.119, n.1, p.1253-1262, 2015.

CAPÍTULO II - Óleos essenciais no tratamento de sementes de pimentão infectadas por *Colletotrichum gloeosporioides*

Revista: Revista Brasileira de Ciências Agrárias

Óleos essenciais no tratamento de sementes de pimentão infectadas por *Colletotrichum gloeosporioides*

Daniele M. Nascimento; Paula L. Santos; Adriana Z. Kronka

Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agronômicas (FCA), Rua José Barbosa de Barros, nº 1780, 18.610-307, Botucatu, SP.

Resumo

O presente trabalho objetivou estudar a ação dos óleos essenciais de cravo (*Syzygium aromaticum*), citronela (*Cymbopogon winterianus*), eucalipto (*Eucalyptus citiodora*), hortelã (*Mentha arvensis*) e manjeriço (*Ocimum basilicum*) sobre a qualidade sanitária e fisiológica de sementes de pimentão infectadas por *Colletotrichum gloeosporioides*. Para o tratamento das sementes com os óleos essenciais, cada óleo foi emulsionado na concentração de 0,25% em solução de água destilada autoclavada + Tween 80. Avaliaram-se a qualidade sanitária das sementes pelo *blotter test* e a qualidade fisiológica, através da germinação, comprimento de plântulas, emergência de plântulas, índice de velocidade de emergência e massa seca. O óleo essencial de cravo resultou em menor incidência do fungo (7,5%), diferindo significativamente da testemunha inoculada não tratada e dos demais tratamentos. Com exceção do tratamento composto pelo óleo essencial de citronela, os demais não afetaram negativamente a germinação das sementes e, para as demais variáveis, não ocorreram diferenças significativas. O óleo essencial de cravo revelou potencialidade na inibição de *C. gloeosporioides*, podendo ser empregado no tratamento de sementes de pimentão visando ao controle deste fungo.

Palavras-chave: antracnose, *Capsicum annum*, controle alternativo, inibição, vigor de sementes

Abstract

The present study aimed to evaluate the action of clove (*Syzygium aromaticum*), citronella (*Cymbopogon winterianus*), eucalyptus (*Eucalyptus citiodora*), mint (*Mentha arvensis*) and basil (*Ocimum basilicum*) essential oils on sanitary and physiological quality of pepper seeds infected by *Colletotrichum gloeosporioides*. For the treatment of the seeds with the essential oils, each oil was emulsified in the concentration of 0.25% in autoclaved distilled water solution

+ Tween 80. The sanitary quality of the seeds was evaluated by the blotter test and the physiological quality, through the germination, seedling length, emergence of seedlings, emergence speed index and dry mass. Clove essential oil resulted in a lower incidence of the fungus (7.5%), differing significantly from the untreated inoculated control and from the other treatments. Except for citronella essential oil, the others did not negatively affect the germination of the seeds and, for the other variables, there were no significant differences. Clove essential oil showed potential in the inhibition of *C. gloeosporioides*, being able to be used in the treatment of pepper seeds for the control of this fungus.

Key words: antracnose, *Capsicum annum*, controle alternativo, inibição, vigor de sementes

INTRODUÇÃO

A antracnose, causada por um complexo de espécies do gênero *Colletotrichum*, é uma das principais doenças fúngicas da cultura do pimentão. Sob condições favoráveis ao desenvolvimento da doença, como épocas chuvosas e em áreas com alta concentração do inóculo, até 100% dos frutos podem ser afetados pelo patógeno (Pavan et al., 2016).

O manejo dessa doença tem se baseado principalmente no emprego de produtos químicos, contudo, Torres-Calzada & Tapia-Tussel (2015) salientam que as espécies de *Colletotrichum* vêm adquirindo resistência aos fungicidas usualmente empregados, como azoxystrobin e thiabendazole. Com isso, a adoção de métodos alternativos tem sido visada, e pesquisas neste sentido vêm sendo estimuladas.

Uma das substâncias com potencial para substituir os fungicidas são os óleos essenciais, oriundos do metabolismo secundário das plantas (Donnaruma et al., 2015). Em se tratando de substâncias naturais, já é conhecido o emprego de extratos vegetais na inibição da antracnose em frutos de pimentão (Alves et al., 2015). Contudo, este fungo pode ser transmitido via sementes (Pavan et al., 2016), sendo esta uma importante fonte de inóculo e meio de introdução e disseminação do patógeno, tornando-se, portanto, o uso de sementes tratadas uma medida essencial de controle.

Diversos fungos presentes em sementes vêm sendo controlados de forma eficaz pela aplicação de óleos essenciais. Em sementes de feijão-fava tratadas com os óleos essenciais de copaíba (*Copaifera langsdorffii*) e manjeriço (*Ocimum basilicum*), a incidência de *Aspergillus*

sp., *Cladosporium* sp., *Fusarium* spp. e *Penicillium* sp. foi severamente reduzida (GOMES et al., 2016). No feijão-de-corda, ou feijão-caupi, o tratamento com o óleo essencial de pimenta-de-macaco (*Piper aduncum* L.) eliminou de forma significativa a microbiota presente nas sementes, incluindo o patógeno *Macrophomina phaseolina*, responsável pela deterioração das mesmas (LOBATO et al, 2007).

No entanto, alguns dos compostos dos óleos essenciais podem apresentar efeito deletério sobre a germinação das sementes. O óleo essencial de citronela (*Cymbopogon winterianus*) afetou de forma negativa o vigor de sementes de feijão-caupi (XAVIER et al., 2012). O tempo de exposição das sementes ao tratamento, assim como a concentração do óleo essencial, podem ser fitotóxicos às sementes, interferindo nos mecanismos fisiológicos e, conseqüentemente, impedindo a germinação (HILLEN et al., 2012).

Diante do exposto o presente estudo objetivou estudar a ação dos óleos essenciais de cravo, citronela, eucalipto, hortelã e manjeriço sobre a qualidade sanitária e fisiológica de sementes de pimentão infectadas por *Colletotrichum gloeosporioides*.

MATERIAL E MÉTODOS

O ensaio foi desenvolvido no Departamento de Proteção Vegetal da Faculdade de Ciências Agrônômicas (FCA), UNESP/Câmpus de Botucatu, SP. O fungo foi isolado de lesões características de antracnose presentes em frutos de pimentão. As sementes utilizadas no estudo foram adquiridas da empresa Isla, sendo a cultivar Yolo Wonder produzida em manejo orgânico e sem tratamento prévio.

Obtenção de sementes infectadas por *Colletotrichum gloeosporioides*

O isolado de *Colletotrichum gloeosporioides* foi inicialmente cultivado em placas de Petri contendo meio de cultura BDA e, após sete dias de incubação a 25 °C e fotoperíodo de 12 h, foram retirados discos de 0,5 cm de colônia fúngica, transferindo-os para placas de Petri contendo BDA acrescido de manitol (33,10 g/L). Após o fungo colonizar toda a placa, sementes de pimentão previamente desinfestadas em hipoclorito de sódio 2% por um minuto e secas sobre folhas de papel de filtro esterilizado, foram depositadas em camada única, permanecendo

em contato com as colônias por 24 h. Após a inoculação, as sementes foram novamente desinfestadas com hipoclorito de sódio a 2% e secas. As sementes não inoculadas foram submetidas ao mesmo processo, porém sem a presença do inóculo no meio de cultura. As sementes inoculadas foram misturadas às sementes sadias de modo a se compor o lote de trabalho.

Obtenção dos óleos essenciais

Foram empregados os óleos essenciais de cravo (*Syzygium aromaticum*), citronela (*Cymbopogon winterianus*), eucalipto (*Eucalyptus critidora*), hortelã (*Mentha arvensis*) e manjeriço (*Ocimum basilicum*), adquiridos da empresa Destilaria Bauru, e com os seguintes compostos majoritários, de acordo com análise fornecida pela empresa: cravo (81% - eugenol); citronela (41% - geraniol, 29% - citronelal e 13% - citronelol); eucalipto (75% - citronelal); hortelã (52,50% - mentol) e manjeriço (74,15% - metil chavicol e 17,60% - linalol).

Tratamento das sementes com os óleos essenciais

Cada óleo foi emulsionado na concentração de 0,25% em 200 mL de água destilada autoclavada, contendo uma gota de Tween 80. As testemunhas foram compostas por sementes infectadas e não infectadas, utilizando-se apenas a solução de água destilada autoclavada + Tween 80. As sementes foram adicionadas ao béquer contendo a solução e agitadas continuamente por 5 min. Posteriormente, foram dispostas em papel toalha autoclavado e secas a temperatura ambiente, por 24 h, sendo então disponibilizadas para a realização dos testes.

Avaliação da qualidade sanitária das sementes

A sanidade das sementes foi avaliada pelo método do papel de filtro (*blotter test*), colocando-se três discos de papel de filtro previamente umedecidos com água destilada em placas de Petri de plástico, distribuindo-se, posteriormente, sobre este substrato, 25 sementes equidistantes. Foram realizadas 16 repetições de 25 sementes por tratamento, totalizando uma amostra de trabalho com 400 sementes. As placas contendo as sementes foram incubadas em BOD a $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$ com fotoperíodo de 12h, por sete dias (Brasil, 2009). Dado este período, as

sementes foram examinadas individualmente, sob microscópio estereoscópico, para a detecção do patógeno. Os resultados foram expressos em porcentagem de sementes infectadas com *C. gloeosporioides*.

Avaliação da qualidade fisiológica das sementes

O efeito do tratamento com os óleos essenciais sobre o potencial fisiológico das sementes foi avaliado pelo teste de germinação, comprimento de plântulas, índice de velocidade de emergência, emergência final e matéria seca de plantas, conforme descritos a seguir.

Germinação e Primeira Contagem de Germinação: Empregou-se o método do rolo de papel, utilizando-se oito repetições de 50 sementes, totalizando-se 400 sementes por tratamento. As sementes foram dispostas sobre dois papéis germitest umedecidos com um volume de água destilada equivalente a 2,5 vezes o peso do papel, sendo cobertos por um terceiro papel e enrolados. Os rolos foram mantidos em BOD a 25°C e as plântulas foram contabilizadas aos sete e 14 dias, de acordo com as normas estabelecidas nas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009). Os resultados foram expressos em porcentagem de sementes mortas e plântulas normais.

Comprimento de plântulas: Foram selecionadas aleatoriamente 10 plântulas normais do teste anterior, aos 14 dias, para medição da parte área e raiz, utilizando-se um paquímetro digital. Os resultados foram expressos em centímetros.

Emergência das plântulas e índice de velocidade de emergência: Foram semeadas 50 sementes por repetição, num total de quatro repetições por tratamento, em bandejas plásticas contendo areia úmida, previamente lavada e esterilizada. As bandejas foram mantidas em casa de vegetação e, as avaliações das plântulas, com cotilédones acima da superfície do substrato, foram realizadas diariamente até 14 dias após a instalação do teste. Aos 14 dias, foram contabilizadas as plântulas normais e os resultados expressos em porcentagem.

O índice de velocidade de emergência foi calculado de acordo com a fórmula de Maguire (1962):

$$\text{IVE} = \frac{E_1 + E_2 + \dots + E_n}{N_1 + N_2 + \dots + N_n}$$

Onde: IVE = índice de velocidade de emergência; E1, E2, ... En = número de plântulas emergidas, computadas na primeira contagem, segunda contagem, ..., última contagem; N1, N1, ... Nn = número de dias de semeadura à primeira, segunda, ..., última contagem.

Massa seca da parte aérea e da raiz: Foram utilizadas 10 plântulas normais por repetição, do teste anterior. A parte aérea e sistema radicular foram submetidos a secagem em estufa a 60°C por 48 horas, e então pesados em balança analítica, para determinação da massa. O resultado foi expresso em gramas.

Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental utilizado nos ensaios de potencial fisiológico das sementes foi inteiramente casualizado, com as repetições especificadas em cada teste. Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F e as médias, comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Dados expressos em porcentagem foram transformados em $\arcsen \sqrt{(x/100)}$ para a realização das análises (Banzatto & Kronka, 2006).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeito dos tratamentos na qualidade sanitária das sementes

A testemunha não inoculada não tratada apresentou uma baixa incidência do fungo (1,3%), enquanto que, na testemunha inoculada não tratada, a incidência foi de 75,8%. Os tratamentos compostos pelos óleos essenciais de manjeriço e eucalipto não diferiram significativamente da testemunha inoculada em relação a incidência de *C. gloeosporioides*. Os demais tratamentos com óleos essenciais diferiram entre si, destacando-se os óleos essenciais de cravo e citronela, com 7,5% e 24%, respectivamente, de incidência do patógenos na sementes (Tabela 1).

Tabela 1. Incidência de *Colletotrichum gloeosporioides* em sementes de pimentão, submetidas ao tratamento com óleos essenciais

Tratamento	Incidência de <i>C. gloeosporioides</i>	
	arc sen $\sqrt{(x/100)}$	(%) ¹
1 Cravo, 0,25%	15,01 d	7,5
2 Citronela, 0,25%	29,00 c	24,0
3 Eucalipto, 0,25%	54,93 a	65,0
4 Hortelã, 0,25%	41,89 b	44,8
5 Manjeriçã, 0,25%	59,68 a	72,0
6 Testemunha inoculada não tratada	62,09 a	75,8
7 Testemunha não inoculada não tratada	3,19 e	1,3
F	87,26**	
dms	10,47	
CV (%)	25,94	

a, b, c... – na coluna, médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

¹dados originais

Apesar do tratamento com o óleo essencial de manjeriçã ter apresentado alta incidência do fungo (72%), não diferindo significativamente da testemunha inoculada não tratada, Gomes et al. (2016) relatam redução considerável de fungos em sementes de feijão-fava tratadas por este óleo em concentrações até 2 mL/L.

Sementes de milho tratadas pelo óleo essencial de cravo tiveram a incidência de *Stenocarpella maydis* reduzida de 39% para 28% (Teixeira et al., 2013), enquanto que em sementes de mandacaru, *Cladosporium* sp. e *Nigrospora* sp. foram eficientemente controlados pelo óleo essencial de citronela (Mata et al., 2009).

São escassas as pesquisas com óleos essenciais em tratamento de sementes visando o controle de patógenos fúngicos. Embora existam relatos da utilização dos óleos essenciais de citronela, eucalipto e hortelã em ensaios *in vitro* e *in vivo*, em se tratando de sua aplicação em sementes, a literatura disponível é insuficiente.

Efeito do tratamento na qualidade fisiológica das sementes

Não ocorreram diferenças significativas entre os tratamentos na primeira contagem de germinação, aos cinco dias (Tabela 2), contudo, na contagem final (Tabela 3), aos sete dias, maior porcentagem de plântulas normais germinadas foi verificada no tratamento com o óleo

essencial de cravo (95,25%), não diferindo da testemunha não inoculada não tratada (94%), mas diferindo da testemunha inoculada não tratada (90%) e do óleo essencial de citronela, o qual resultou em baixa germinação das sementes tratadas (87,50%).

Tabela 2. Primeira contagem de germinação de sementes de pimentão, submetidas ao tratamento com óleos essenciais

Tratamento	Primeira Contagem do Teste de Germinação	
	arc sen $\sqrt{(x/100)}$	(%) ¹
1 Cravo, 0,25%	60,33 a	74,00
2 Citronela, 0,25%	63,83 a	80,50
3 Eucalipto, 0,25%	65,42 a	82,25
4 Hortelã, 0,25%	69,69 a	87,75
5 Manjeriçã, 0,25%	68,54 a	86,50
6 Testemunha inoculada não tratada	64,21 a	81,00
7 Testemunha não inoculada não tratada	69,54 a	87,75
F	1,79 ^{NS}	
dms	11,98	
CV (%)	7,91	

a – na coluna, médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

¹ dados originais

Tabela 3. Resultados do teste de germinação em rolo de papel de sementes de pimentão, submetidas ao tratamento com óleos essenciais

Tratamento	Plântulas normais		Sementes mortas	
	arc sen $\sqrt{(x/100)}$	(%) ¹	arc sen $\sqrt{(x/100)}$	(%) ¹
1 Cravo, 0,25%	77,80 a	95,25	12,20 c	4,75
2 Citronela, 0,25%	69,39 c	87,50	20,61 a	12,50
3 Eucalipto, 0,25%	75,63 ab	93,75	14,37 bc	6,25
4 Hortelã, 0,25%	73,88 abc	92,25	16,12 abc	7,75
5 Manjeriçã, 0,25%	74,11 abc	92,50	15,89 abc	7,50
6 Testemunha inoculada não tratada	71,78 bc	90,00	18,22 ab	10,00
7 Testemunha não inoculada não tratada	75,89 ab	94,00	14,11 bc	6,00
F	5,17**		5,17**	
dms	5,65		5,65	
CV (%)	3,32		15,43	

a, b, c... – na coluna, médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

¹ dados originais

O óleo essencial de manjeriçã resultou em 92,50% de germinação das sementes, não diferindo significativamente dos demais tratamentos. Brito et al. (2012) evidenciaram os efeitos positivos decorrentes da aplicação desse óleo na germinação de sementes de mandacaru.

O efeito do óleo essencial de citronela na germinação das sementes de pimentão corrobora com o relatado por Xavier et al. (2012), em sementes de feijão-caupi, que relataram ação alelopática deste óleo sobre a germinação, atribuindo este efeito aos seus compostos majoritários, citronelal e geraniol. Mata et al. (2009) constataram que apenas 53% das sementes de mandacaru germinaram quando tratadas com 1% do óleo de citronela.

Teixeira et al. (2013) trataram sementes de milho infectadas por *Stenocarpella maydis* com o óleo essencial de cravo e, ao avaliarem a germinação, verificaram 89% de plântulas normais, valor este superior à testemunha.

Para os parâmetros comprimento de plântulas (Tabela 4), índice de velocidade de emergência, emergência final e matéria seca (Tabela 5) não ocorreram diferenças significativas entre os tratamentos.

Tabela 4. Comprimento de plântulas de pimentão oriundas de sementes submetidas ao tratamento com óleos essenciais

Tratamento	Comprimento (cm)		
	Raiz primária	Hipocótilo	Total
1 Cravo, 0,25%	7,7 a	2,9 a	10,6 a
2 Citronela, 0,25%	6,8 a	2,7 a	9,5 a
3 Eucalipto, 0,25%	6,1 a	2,9 a	9,0 a
4 Hortelã, 0,25%	6,5 a	2,9 a	9,4 a
5 Manjeriçã, 0,25%	7,2 a	3,0 a	10,2 a
6 Testemunha inoculada não tratada	6,7 a	2,5 a	9,2 a
7 Testemunha não inoculada não tratada	7,8 a	3,1 a	10,9 a
F	2,39 ^{NS}	1,14 ^{NS}	2,84 ^{NS}
dms	1,88	0,89	2,04
CV (%)	11,78	13,53	9,04

a – em cada coluna, médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 5. Índice de velocidade de emergência, emergência final e matéria seca de plantas de pimentão, oriundas de sementes submetidas ao tratamento com óleos essenciais

Tratamento	IVE	Emergência final		Matéria seca (g)
		arc sen $\sqrt{(x/100)}$	(%) ¹	
1 Cravo, 0,25%	11,0 a	61,5 a	75,0	0,493 a
2 Citronela, 0,25%	9,1 a	60,3 a	74,5	0,462 a
3 Eucalipto, 0,25%	12,0 a	72,8 a	90,5	0,473 a
4 Hortelã, 0,25%	12,2 a	68,4 a	86,0	0,467 a
5 Manjeriçã, 0,25%	11,4 a	69,8 a	88,0	0,477 a
6 Testemunha inoculada não tratada	12,2 a	73,3 a	91,5	0,486 a
7 Testemunha não inoculada não tratada	11,0 a	64,7 a	81,0	0,472 a
F	1,51 ^{NS}	1,59 ^{NS}		1,01 ^{NS}
dms	4,02	19,94		0,062
CV (%)	15,14	11,41		5,59

a – em cada coluna, médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

¹ dados originais

Os resultados obtidos referentes ao óleo essencial de cravo divergem dos encontrados na literatura. Gomes et al. (2016) relatam que este óleo influenciou negativamente o vigor de plântulas de feijão-fava, sendo observadas reduções na primeira contagem de germinação, índice de velocidade de emergência e comprimento de raiz e parte aérea, empregando-se 2,0 mL/L do óleo essencial. Os autores atribuem esse efeito a um dos compostos majoritários do óleo, o eugenol, que, em altas concentrações, pode se tornar tóxico. Visto que as concentrações adotadas por Gomes et al. (2016) foram próximas a desse trabalho, ressalta-se que a reação da semente ao óleo varia de acordo com a cultura.

Os dados resultantes do experimento em casa de vegetação não evidenciaram diferenças entre os tratamentos. Rodrigues et al. (2006), ao avaliarem o extrato vegetal de alfavaca-cravo (*Ocimum gratissimum*) em tratamento de sementes de milho infectadas por *Bipolaris sorokiniana*, pelo teste de areia, também não observaram diferenças em relação a testemunha na altura, emergência e massa fresca das plântulas oriundas de sementes tratadas.

Esses resultados sugerem que o tratamento de sementes de pimentão com o óleo essencial de cravo a 0,25% pode ser uma alternativa promissora no controle da antracnose, por não afetar a germinação e vigor das sementes e proporcionar uma taxa de controle em torno de 90% em relação a testemunha inoculada não tratada, tendo maior eficiência que os demais óleos testados.

LITERATURA CITADA

Alves, K.F.; Laranjeira, D.; Câmara, M.P.S.; Câmara, C.A.G.; Michereff, S.J. Efficacy of plant extracts for anthracnose control in bell pepper fruits under controlled conditions. *Horticultura Brasileira*, v.33, n.3, p.332-338, 2015. < <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-053620150000300009>>

Banzatto, D.A.; Kronka, S.N.K. *Experimentação agrícola*. 4.ed. Jaboticabal: Funep, 2006. 237p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA/ACS, 2009. 395p.

Brito, N.M.; Nascimento, L.C.; Coelho, M.S.E.; Félix, L.P. Efeito de óleos essenciais na germinação de sementes de *Cereus jamacaru*. Revista Brasileira de Ciências Agrárias, v.5, n.2, p.207-211, 2010. <<http://dx.doi.org/10.5039/agraria.v5i2a702>>

Donnaruma, L.; Milano, F.; Trotta, S.; Annesi, T. Use of essential oil in control strategies against *Zucchini* powdery mildew. Journal of Phytopathology, v.163, n.11-12, p.877-885, 2015. <<http://dx.doi.org/10.1111/jph.12387>>

Gomes, R.S.S.; Nunes, M.C.; Nascimento, L.C.; Souza, J.O.; Porcino, M.M. Eficiência de óleos essenciais na qualidade sanitária e fisiológica em sementes de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.). Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, v.18, n.1, p.270-287, 2016. <http://dx.doi.org/10.1590/1983-084X/15_117>

Hillen, T.; Schwan-Estrada, K.R.F.; Mesquini, R.M.; Cruz, M.E.S.; Stangarlin, J.R.; Nozaki, M. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais no controle de alguns fitopatógenos fúngicos *in vitro* e no tratamento de sementes. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, v.14, n.3, p.439-445, 2012. <<http://dx.doi.org/10.1590/S1516-05722012000300003>>

Lobato, A.K.S.; Santos, D.G.C.; Oliveira, F.C.; Gouvea, D.D.S.; Torres, G.I.O.S.; Lima Júnior, J.A.; Oliveira Neto, C.F.; Silva, M.H.L. Ação do óleo essencial de *Piper aduncum* L. utilizado como fungicida natural no tratamento de sementes de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. Revista Brasileira de Biociências, v.5, supl.2, p.915-7, 2007. <<http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/viewFile/750/626>>. 20 Dez.2016.

Maguire, J. D. Speed of germination aid in selection and evaluation for seedling and vigour. Crop Science, v.2, n.2, p.176-177, 1962. <<https://dl.sciencesocieties.org/publications/cs/abstracts/2/2/CS0020020176/>>. 20 Dez.2016.

Mata, M.F.; Araújo, E.; Nascimento, L.C.; Souza, A.E.F.; Viana, S. Incidência e controle alternativo de patógenos em sementes de mandacaru (*Cereus jamacaru* DC, Cactaceae). Revista Brasileira de Biociências, v.7, n.4, p.327-334, 2009. <<http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/1115/883>>. 20 Dez.2016.

Oliveira, J.A.; Silva, T.T.A.; Pinho, E.V.R.V.; Abreu, L.A.S. Secagem e armazenamento de sementes de sorgo com alto e baixo teor de tanino. Revista Brasileira de Sementes, v.33, n.4 p.699-710, 2011. <<http://dx.doi.org/10.1590/S0101-31222011000400012>>

Pavan, M.A.; Krause-Sakate, R.; Moura, M.F.; Kurozawa, C. Doenças das solanáceas. In: Amorim, L.; Rezende, J.A.M.; Bergamin Filho, A.; Camargo, L.E.A. Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas. 5 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2016., v.2, cap.68, p.677-686.

Rodrigues, E.A.; Schwan-Estrada, K.R.F.; Stangarlin, J.R.; Scapim, C.A.; Fiori-Tutida, A.C.G. Potencial da planta medicinal *Ocimum gratissimum* no controle de *Bipolaris sorokiniana* em sementes de trigo. Acta Scientiarum Agronomy, v.28, n.2, p.213-220, 2006. < <http://dx.doi.org/10.4025/actasciagron.v28i2.1071>>

Teixeira, G.A.; Alves, E.; Amaral, D.C.; Machado, J.D.; Perina, F.J. Essential oils on the control of stem and ear rot in maize. Ciência Rural, v.43, n.11, p.1945-1951, 2013. < <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782013001100004>>

Torres-Calzada, C.; Tapia-Tussel, R. Sensitivity of *Colletotrichum truncatum* to four fungicides and characterization of thiabendazole-resistant isolates. Plant Disease, v.99, n.11, p.1560-1595, 2015. < <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-11-14-1183-RE>>

Xavier, M.V.A.; Oliveira, C.R.F.; Brito, S.S.S.; Matos, C.H.C.; Pinto, M.A.D.S.C. Viabilidade de sementes de feijão caupi após o tratamento com óleo essencial de citronela (*Cymbopogon winterianus* Jowitt). Revista Brasileira de Plantas Medicinais, v.14, n.esp., p.250-254, 2012. < <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-05722012000500021>>

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O controle alternativo de doenças de plantas vem sendo visado por produtores orgânicos e por parte da sociedade que demandam alimentos saudáveis em sua dieta. Devido à necessidade de se reduzir os produtos químicos utilizados na cultura do pimentão, vem sendo estudada a ação de substâncias naturais com potencial para substituí-los, dentre elas, os óleos essenciais.

Os resultados encontrados neste trabalho indicam oito óleos essenciais promissores quanto à inibição *in vitro* de *Colletotrichum gloeosporioides*, com destaque para os óleos de cravo, citronela, eucalipto, hortelã e manjerição que, independente da concentração testada, não possibilitaram o desenvolvimento do fungo. Com esses dados, abre-se a possibilidade de estudos posteriores, em casa de vegetação, a fim de se comprovar a eficácia desses óleos *in vivo*.

O óleo essencial de cravo, quando empregado em tratamento de sementes de pimentão inoculadas com *C. gloeosporioides*, além de reduzir a incidência do patógeno, não afetou a qualidade fisiológica das sementes e, como a semente se constitui no principal meio de disseminação e introdução de patógenos em novas áreas, essa medida de controle pode ser incluída no manejo da antracnose. Para trabalhos futuros, sugere-se que seja investigada a ação dos compostos majoritários isolados desse óleo, de modo a selecionar os responsáveis pelo efeito fungicida e, então, elaborar um produto à base do mesmo.

REFERÊNCIAS

- ALVES, K. F.; LARANJEIRA, D.; CÂMARA, M. P. S.; CÂMARA, C. A. G.; MICHEREFF, S. J. Efficacy of plant extracts for anthracnose control in bell pepper fruits under controlled conditions. **Horticultura Brasileira**, v. 33, p. 332-338, 2015.
- AVILA-SOSA, R.; GASTÉLUM-REYNOSO, G.; GARCÍA-JUÁREZ, M.; MENESES-SÁNCHEZZ, M. C.; NAVARRO-CRUZ, A. R.; DÁVILA-MÁRQUEZ, R. M. Evaluation of different mexican plant extracts to control anthracnose. **Food Bioprocess Technology**, v. 4, p. 655-659, 2011.
- ANVISA. **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em alimentos (PARA)**, 2014. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/d67107004634368583a5bfec1b28f937/Relat%C3%B3rio+PARA+2012+2%C2%AA+Etapa+-+17_10_14-Final.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 05 dez, 2016.
- BARBOSA, M. S.; VIEIRA, G. H. C.; TEIXEIRA, A. V. Atividade biológica *in vitro* de própolis e óleos essenciais sobre o fungo *Colletotrichum musae* isolado de bananeira (*Musa* spp.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 2, p. 254-261, 2015.
- BUENO, C. R. N. C. **Identificação e caracterização das espécies de *Colletotrichum* causadoras de antracnose em hortaliças solanáceas**. 2005. 61 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.
- BRITO, N. M.; NASCIMENTO, L. C.; COELHO, M. S. E.; FÉLIX, L. P. Efeitos de óleos essenciais na germinação de sementes de *Cereus jamacaru*. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 5, n. 2, p. 207-211, 2010.
- BRITO, N. M.; NASCIMENTO, L. C. Potencial fungitóxico de extratos vegetais sobre *Curvularia eragrostidis* (P. Henn.) Meyer *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v.17, n.2, -230-238, 2015.
- COSTA, L. C. B.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V.; COSTA, J. C. B.; ALVES, P. B.; NICULAU, E. S. *In vitro* antifungal activity of *Ocimum selloi* essential oil and methylchavicol against phytopathogenic fungi. **Revista Ciência Agronômica**, v. 46, n. 2, p. 428-435, 2015.

DONNARUMMA, L.; MILANO, F.; TROTTA, S.; ANNESI, T. Use of essential oil in control strategies against *Zucchini* powdery mildew. **Journal of Phytopathology**, v. 163, n. 877-885, 2015.

EDIRISINGHE, M.; ALI, A.; MAQBOOL, M.; ALDERSON, P. G.; Chitosan controls postharvest anthracnose in bell pepper by activating defense-related enzymes. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 12, p. 4078-4083, 2014.

GUÉDEZ, C.; CANIZALES, L.; AVENDANO, L.; SCORZA, J.; CASTILLO, C.; OLIVAR, R.; MÉNDEZ, Y.; SÁNCHEZ, L. Actividad antifúngica del aceite esencial de naranja (*Citrus sinensis* L.) sobre hongos postcosecha en frutos de lechosa (*Carica papaya* L.). **Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología**, v. 34, p. 81-85, 2014.

HADDAD, F.; MAFFIA, L. A.; MIZUBUTI, E. S. G. Avaliação de fungicidas para o controle de *Colletotrichum gloeosporioides* em cebola. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 28, p. 435-437, 2003

HILLEN, T.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; MESQUINI, R. M.; CRUZ, M. E. S.; STANGARLIN, J. S.; NOZAKI, M. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais no controle de alguns fitopatógenos fúngicos *in vitro* e no tratamento de sementes. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 14, n. 3, p. 439-445, 2012.

HOSSAIN, M. A.; ISMAIL, Z.; RAHMAN, A.; KANG, S. C. Chemical composition and anti-fungal properties of the essential oils and crude extracts of *Orthosiphon stamineus* Benth. **Industrial Crops and Products**, v. 27, p. 328-334, 2008.

KUROZAWA, C.; PAVAN, M.A.; KRAUSE-SAKATE, R. Doenças das solanáceas. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. **Manual de fitopatologia**. Doenças das plantas cultivadas. 4.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v.2., cap.62, p.665-675.

LAM-SÁNCHEZ, A. **Centros de origem das plantas cultivadas**: tradução e compilação. Jaboticabal: UNESP/FUNEP. 1992, 45p.

MARASCHIN-SILVA, F. **Extração aquosa de aleloquímicos e bioensaios laboratoriais de alelopatia**. 2004. 87 p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2004.

MEDICE, R.; ALVES, E.; ASSIS, R. T.; MAGNO JÚNIOR, R. G.; LOPES, E. A. G. L. Óleos essenciais no controle da ferrugem asiática da soja *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 1, p. 83-90, 2007.

PAVAN, M.A.; KRAUSE-SAKATE, R.; MOURA, M.F; KUROZAWA, C. Doenças das solanáceas. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. **Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**. 5 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2016., v.2, cap.68, p.677-686.

PEREIRA, A. V.; OTTO, R. F.; REGHIN, M. Y. Efeito da proteção com agrotêxtil na produtividade da cultura do pimentão em Ponta Grossa PR, **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 19, suplemento CD-ROM, julho – 2001.

RAJ, S. T.; CHRISTOPHER, D. J.; SUJI, H. A. Efficacy of *Pseudomonas fluorescens* on control of chilli fruit rot caused by *Colletotrichum capsici*. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 12, p. 4078-4083, 2014.

REIS, A.; BOITEUX, L.; HENZ, G. P. **Antracnose em Hortaliças da Família Solanacea**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2009. 9p. (Embrapa Hortaliças. Circular Técnica 79).

SCHURT, D. A.; SILVA JÚNIOR, G. J.; DHINGRA, O. D. Ocorrência de *Colletotrichum capsici* em sementes de pimentão (*Capsicum annum* L.). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.30, p.136, 2005. Suplemento. Apresentado no CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 38., 2005, Brasília.

SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.F. Extratos e óleos essenciais de plantas medicinais na indução de resistência. In: CAVALCANTI, L.S., DI PIERO, R.M., CIA, P., PASCHOLATI, F., RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. (Eds.) **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba SP. FEALQ. 2005. p. 125-138.

SEFU, G.; SATHEESH, N.; BERECHA, G. Effect of essential oils treatment on anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) disease development, quality and shelf life of mango fruits (*Mangifera indica* L). **American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Science**, v. 15, n. 11, p. 2169-2169, 2015.

SILVA, L. P.; UENO, B.; DEGENHARDT, J.; MOURA, A. B. Caracterização morfológica e cultural de isolados de *Colletotrichum* spp. de pimenta e pimentão do Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.32, p. 291, 2007. Suplemento..

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

SOUSA, RMS; SERRA, IMRS; 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.

TEIXEIRA, R. **Diversidade em *Capsicum*: análise molecular, morfoagronômica e química**. 114f. (Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Viçosa). 1996.

TORRES-CALZADA, C.; TAPIA-TUSSEL, R. Sensitivity of *Colletotrichum truncatum* to four fungicides and characterization of thiabendazole-resistant isolates. **Plant Disease**, v. 99, n. 11, p.1590-1595, 2015.

TOZZE JUNIOR., H. J. MELLO, M. B. A.; MASSOLA JÚNIOR, N. S. Caracterização morfológica e fisiológica de isolados de *Colletotrichum* sp. causadores de antracnose em solanáceas. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.32, n.1, p.71-19, 2006.

TOZZE JUNIOR, H. T. **Caracterização e identificação de espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose do pimentão (*Capsicum annuum*) no Brasil**. 2007. Tese de Doutorado. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz.

VALVERDE, R. M. V. **Composição bromatológica da pimenta malagueta in natura e processada em conserva**. 54 f. Dissertação (Mestrado Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, Bahia. 2011.

VIVAS, M.; SILVA, D, G.; COSTA, H.; SILVEIRA, S. F.; PEREIRA, A. J. Inibição in vitro do crescimento micelial de *Colletotrichum acutatum* por extrato aquoso e óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf e *Eucalyptus citriodora* Hooker. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, p. 265, 2006.

XAVIER, M. V. A.; OLIVEIRA, C. R. F.; BRITO, S. S. S.; MATOS, C. H. C.; PINTO, M. A. D. S. C. Viabilidade de sementes de feijão caupi após o tratamento com óleo essencial de citronela (*Cymbopogon winterianus* Jowitt). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 14, p. 250-254, 2012.