

Efeito de misturas de óleos essenciais de espécies de citros no controle de *Colletotrichum gloeosporioides*

Effect of mixtures of essential oils of citrus species on the control of *Colletotrichum gloeosporioides*

Efecto de mezclas de aceites esenciales de especies cítricas sobre el control de *Colletotrichum gloeosporioides*

Recebido: 19/11/2020 | Revisado: 01/12/2020 | Aceito: 02/12/2020 | Publicado: 05/12/2020

Plínio Tércio Medeiros de Azevedo

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8115-6522>

Universidade Federal de Campina Grande, Brasil

E-mail: eng.pliniotercio@gmail.com

Kevison Romulo da Silva França

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0180-1021>

Universidade Federal de Alagoas, Brasil

E-mail: kevsfranca@hotmail.com

Yaroslávia Ferreira Paiva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2096-2122>

Universidade Federal de Campina Grande, Brasil

E-mail: yaroslaviapaiva@gmail.com

Tiago Augusto Lima Cardoso

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5067-0545>

Universidade Federal de Campina Grande, Brasil

E-mail: tiagoipj@yhao.com.br

Everton Vieira da Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1256-7704>

Universidade Federal de Campina Grande, Brasil

E-mail: evertonquimica@hotmail.com

Resumo

Este trabalho avalia o potencial fungitóxico de misturas de óleos essenciais de limão Thaiti, laranja doce e tangerina sobre *Colletotrichum gloeosporioides*. Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial $7 \times 8 + 2$, sendo 7

formulações de óleos essenciais (4 misturas e 3 óleos essenciais puros utilizados como comparativos) em 8 concentrações cada (0,0125; 0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,25; 0,5 e 1,0%), uma testemunha negativa (0,0%), uma testemunha positiva (fungicida comercial Thiram na concentração recomendada pelo fabricante - 1 mL L⁻¹) com 5 repetições cada. Os diferentes tratamentos foram incorporados em meio de cultura BDA (Batata Dextrose Ágar) e vertidos em placas de Petri. As placas contendo os tratamentos foram inoculadas com *C. gloeosporioides* e incubadas durante sete dias a 27 ± 2°C. O crescimento foi mensurado diariamente e para verificar a diferença entre tratamentos foram calculados a porcentagem de inibição de crescimento micelial e o índice de velocidade de crescimento micelial. Todas as concentrações de óleos essenciais de citrus e suas misturas inibiram o crescimento micelial de *C. gloeosporioides*. As maiores inibições foram obtidas utilizando-se os óleos essenciais puros de limão, laranja e tangerina, com valores médios de inibição de 67,7; 56,1 e 55,9%, respectivamente. Enquanto que as misturas promoveram inibições menores que o tratamento com o fungicida comercial. Recomenda-se a realização de testes *in vivo* para verificar se as misturas de óleos essenciais de citrus apresentam melhor controle sobre o crescimento de *C. gloeosporioides* em condições de campo.

Palavras-chave: *Citrus aurantifolia*; *Citrus aurantium*; *Citrus reticulata*; Controle alternativo; Crescimento micelial; Fungitoxidade; Fungos fitopatogênicos.

Abstract

This work evaluates the fungitoxic potential of essential oils blends of lemon 'Thaiti', sweet orange, and mandarin on *Colletotrichum gloeosporioides*. The experiments occurred in a completely randomized design in a 7x8+2 factorial scheme, with seven formulations of essential oils (4 mixtures and 3 pure essential oils used as comparatives) in eight concentrations each (0.0125, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.25, 0.5, and 1.0%), one negative control (0.0%), and one positive control (commercial Thiram fungicide at the concentration recommended by the manufacturer - 1 mL L⁻¹), with 5 repetitions each. The different treatments were incorporated into PDA culture medium (Potato Dextrose Agar) and poured into Petri dishes. The plates containing the treatments were inoculated with *C. gloeosporioides* and incubated for seven days at 27±2°C. Growth was measured daily to calculate the percentage of mycelial growth inhibition and the mycelial growth rate index. All concentrations of citrus essential oils and the blends inhibited the mycelial growth of *C. gloeosporioides*. The pure essential oils of lemon, orange, and tangerine provided the greatest inhibitions, with average values of 67.7, 56.1, and 55.9%, respectively. The blends promoted lower inhibitions than the treatment with the

commercial fungicide. We recommend to carry out *in vivo* tests to verify if the blends of citrus essential oils have better control over the growth of *C. gloeosporioides* under field conditions.

Keywords: *Citrus aurantifolia*; *Citrus aurantium*; *Citrus reticulata*; Alternative control; Mycelial growth; Fungitoxicity; Phytopathogenic fungi.

Resumen

Este trabajo evalúa el potencial fungitóxico de mezclas de aceites esenciales de limón tailandés, naranja dulce y mandarina sobre *Colletotrichum gloeosporioides*. Los experimentos se realizaron en un diseño completamente al azar en un esquema factorial 7x8+2, con 7 formulaciones de aceites esenciales (4 mezclas y 3 aceites esenciales puros usados como comparativos) en 8 concentraciones cada uno (0.0125; 0.025; 0.05; 0, 1, 0.2, 0.25, 0.5 y 1.0%), un control negativo (0.0%), un control positivo (fungicida comercial Thiram en la concentración recomendada por el fabricante - 1 mL L⁻¹) con 5 repeticiones cada uno. Los diferentes tratamientos se incorporaron en medio de cultivo BDA (Papa Dextrosa Agar) y se vertieron en placas de Petri. Las placas que contenían los tratamientos se inocularon con *C. gloeosporioides* y se incubaron durante siete días a 27 ± 2 ° C. El crecimiento se midió diariamente y para verificar la diferencia entre tratamientos, se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial y el índice de tasa de crecimiento micelial. Todas las concentraciones de aceites esenciales de cítricos y sus mezclas inhibieron el crecimiento micelial de *C. gloeosporioides*. Las mayores inhibiciones se obtuvieron utilizando aceites esenciales puros de limón, naranja y mandarina, con valores promedio de inhibición de 67,7; 56,1 y 55,9%, respectivamente. Mientras que las mezclas promovieron menos inhibiciones que el tratamiento con el fungicida comercial. Se recomiendan pruebas *in vivo* para comprobar si las mezclas de aceites esenciales de cítricos tienen un mejor control sobre el crecimiento de *C. gloeosporioides* en condiciones de campo.

Palabras clave: *Citrus aurantifolia*; *Citrus aurantium*; *Citrus reticulata*; Control alternativo; Crecimiento micelial; Fungoxicidad; Hongos fitopatógenos.

1. Introdução

Pertencente à família da Rutaceae, as frutas dos gêneros *Citrus* fazem parte das frutas mais cultivadas no mundo inteiro, incluindo toranjas, laranjas, limas, tangerinas, mandarinas e limões (Sharma *et al.*, 2017). Este gênero é bastante conhecido por apresentar elevadas propriedades nutricionais e medicinais, sendo uma ótima fonte de vitaminas, minerais, fibras e

compostos bioativos, como carotenoides, alcaloides, flavonoides e polifenóis (Okwi & Emenike, 2006; Mahato *et al.*, 2018).

Os frutos cítricos possuem diversos metabólitos secundários, formados por misturas de compostos em diferentes concentrações, presentes principalmente nas cascas, onde atuam no sistema de proteção da própria planta, a exemplo dos terpenoides, carotenoides, cumarinas, furanocumarinas e flavonoides, sobretudo as flavononas e flavonas (Ahmad *et al.*, 2006). Os óleos essenciais de frutas cítricas como o limão (*Citrus aurantifolia*), laranja doce (*Citrus aurantium*) e tangerina (*Citrus reticulata*) têm sido estudados há alguns anos e as suas atividades biológicas, incluindo atividade antimicrobiana, vêm sendo bem documentadas (Choi *et al.*, 2000; Siskos *et al.*, 2008; Patil *et al.*, 2009; Araújo Júnior *et al.*, 2010). O limoneno, um hidrocarboneto monoterpeneo, tem sido apontado como constituinte majoritário nos óleos essenciais de frutas cítricas (Njoroge *et al.*, 2006), havendo relatos na literatura da sua potencialidade como agente antifúngico (Chee *et al.*, 2009; Marei *et al.*, 2012).

Fungos fitopatogênicos podem afetar todas as partes das plantas, desde o seu sistema radicular até os seus frutos, causando uma diminuição na produtividade e na qualidade, além da redução da validade dos produtos acometidos por doenças superficiais, devido à destruição do tecido, tornando-os menos atrativos comercialmente (Gadelha, 2002). O gênero *Colletotrichum*, por exemplo, inclui agentes patogênicos causadores da antracnose, sendo o *Colletotrichum gloeosporioides* o principal agente infectante. Esta doença distribui-se no mundo inteiro e está associada a uma grande variedade de plantas cultivadas (Dean *et al.*, 2012; Lima *et al.*, 2015; Pereira, 2016). Ela afeta principalmente os frutos e os sintomas surgem nas etapas de pré e pós-colheita como pequenos pontos de cor marrom tendendo a preto, que crescem e espalham-se até atingir grande parte do fruto, necrosando-o por completo (Pegg *et al.*, 2002; Barbosa *et al.*, 2015).

O tratamento químico tem sido a principal abordagem no controle da antracnose em função da sua eficácia e facilidade de aplicação (Lima *et al.*, 2012). No entanto, a alta toxicidade e o gerenciamento inadequado desses produtos ocasionam impactos ambientais, danos à saúde humana e ainda favorecem o surgimento de cepas com resistência aos agroquímicos utilizados com frequência (Cruz *et al.*, 2010; Bebbber & Gurr, 2015; Piccini *et al.*, 2016; Rodrigues, 2006).

Nessa perspectiva, é necessário investigar produtos alternativos aos defensivos utilizados convencionalmente, que sejam eficazes no controle desses patógenos e que não ofereçam riscos ao meio ambiente ou à saúde humana. Entre os produtos testados para esta finalidade, encontram-se os óleos essenciais, cuja atividade antifúngica tem sido comprovada em diversos estudos.

Brand (2012) demonstrou que a exposição ao limoneno inibiu o crescimento e germinação de esporos de espécies de *Colletotrichum* isoladas de plantas de citrus. O citral (mistura dos isômeros neral e geranial presente nos óleos essenciais) reduziu crescimento micelial de *Fusarium oxysporum cubense*, *C. gloeosporioides*, *Bipolaris* sp. e *Alternaria alternata* (Guimarães *et al.*, 2011). O óleo essencial de tangerina com 46,7% limoneno é capaz de inibir o crescimento de *A. alternata*, *Rhizoctonia solani* e *Curvularia lunata* (Chutia *et al.*, 2009).

Tendo em vista uma grande quantidade de compostos bioativos presentes nos óleos essenciais do gênero *Citrus* e também por possuírem diversas propriedades biológicas, incluindo atividade antimicrobiana (Choi *et al.*, 2000), a utilização dos óleos essenciais de *Citrus* podem ser uma alternativa promissora no controle de doenças causadas por fungos fitopatogênicos. Assim, objetivou-se com o presente trabalho avaliar o efeito *in vitro* dos óleos essenciais de limão Thaiti, laranja doce, tangerina e diferentes misturas dos três óleos sobre o crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*.

2. Metodologia

2.1. Local dos experimentos e obtenção dos materiais

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Microbiologia de Alimentos, do Centro de Ciências e Tecnologia Agroalimentar, da Universidade Federal de Campina Grande, Campus de Pombal. O experimento foi realizado no período de agosto a setembro de 2019.

O isolado fúngico 3331 de *Colletotrichum gloeosporioides* foi fornecido pela coleção de fungos fitopatogênicos Prof. Maria Menezes da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) e preservado em água destilada estéril pelo método Castellani até a realização dos experimentos (Castellani, 1967).

Os óleos essenciais de limão Taiti (*Citrus aurantifolia*), laranja doce (*Citrus aurantium*) e tangerina (*Citrus reticulata*) foram obtidos pelo processo de prensagem a frio da casca dos frutos, de acordo com as técnicas adotadas pela FERQUIMA – Indústria e Comércio Ltda, Vargem Grande – SP.

As misturas foram obtidas a partir da adição dos 3 óleos essenciais em tubos de ensaio estéreis com posterior agitação em agitador tipo vortex. O preparo das misturas foi feito de acordo com as seguintes proporções:

- Mistura 1 (25% limão + 50% laranja + 25% tangerina);

- Mistura 2 (25% limão + 25% laranja + 50% tangerina);
- Mistura 3 (50% limão+ 25% laranja + 25% tangerina);
- Mistura 4 (33,33% limão + 33,33% laranja + 33,34% tangerina);

2.2. Tratamentos e delineamento experimental

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 7x8+2, sendo 7 formulações de óleos essenciais (4 misturas e 3 óleos essenciais puros para comparação) em 8 concentrações (0,0125; 0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,25; 0,5 e 1,0%), uma testemunha negativa (0,0%), uma testemunha positiva (fungicida comercial Thiram na concentração recomendada pelo fabricante – 1 mL L⁻¹) com 5 repetições cada.

As concentrações testadas foram determinadas a partir de concentrações iniciais baseadas na literatura (Chutia *et al.*, 2009; Vitoratos *et al.*, 2013; Aloui *et al.*, 2014). Para a obtenção das concentrações finais foi utilizado o procedimento de diluição direta em meio de cultura fundente (Pereira *et al.*, 2006).

2.3. Procedimentos experimentais

Os diferentes tratamentos foram incorporados ao meio de cultura BDA (Batata Dextrose Ágar) e vertidos em placas de Petri. Após a solidificação, discos miceliais de 1cm (Ø) foram retirados das margens de uma cultura de 7 dias e transferidos ao centro de cada placa contendo os tratamentos. As placas foram então envoltas em plástico filme e incubadas por 7 dias em incubadora B.O.D (*Biochemical Oxygen Demand*) a 27±2°C.

O crescimento micelial foi mensurado diariamente até que a colônia tomasse toda a superfície do meio de cultura em uma das placas ou no período máximo de 7 dias. A avaliação do crescimento micelial consistiu em medições diárias do diâmetro das colônias, obtidas através da média de duas medidas perpendiculares usando paquímetro digital. Com o resultado das medidas, foram calculadas a porcentagem de inibição de crescimento micelial (PIC; Bastos 1997) e o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM; Oliveira, 1991), segundo as fórmulas (1) e (2):

$$PIC = \frac{(\text{Crescimento da testemunha} - \text{Crescimento do tratamento}) \times 100}{\text{Crescimento da testemunha}} \quad (1)$$

$$IVCM = \sum \frac{\text{Diâmetro médio atual} - \text{Diâmetro médio anterior}}{\text{Número de dias após a inoculação}} \quad (2)$$

2.4. Análise estatística dos dados

Para verificar o efeito das concentrações das misturas e dos óleos isoladamente sobre o crescimento do fungo foram realizadas regressões quadráticas. As regressões foram realizadas no programa R Core Team 3.5.1.

O efeito das formulações dos óleos, concentrações e interação entre essas duas fontes de variação sobre o crescimento do fungo foi verificada utilizando uma two-way PERMANOVA (ANOVA com 9999 permutações). Para testar a diferença entre tratamentos com as formulações de óleos e tratamento com fungicida (testemunha positiva), aplicou-se o teste de Scott-Knott.

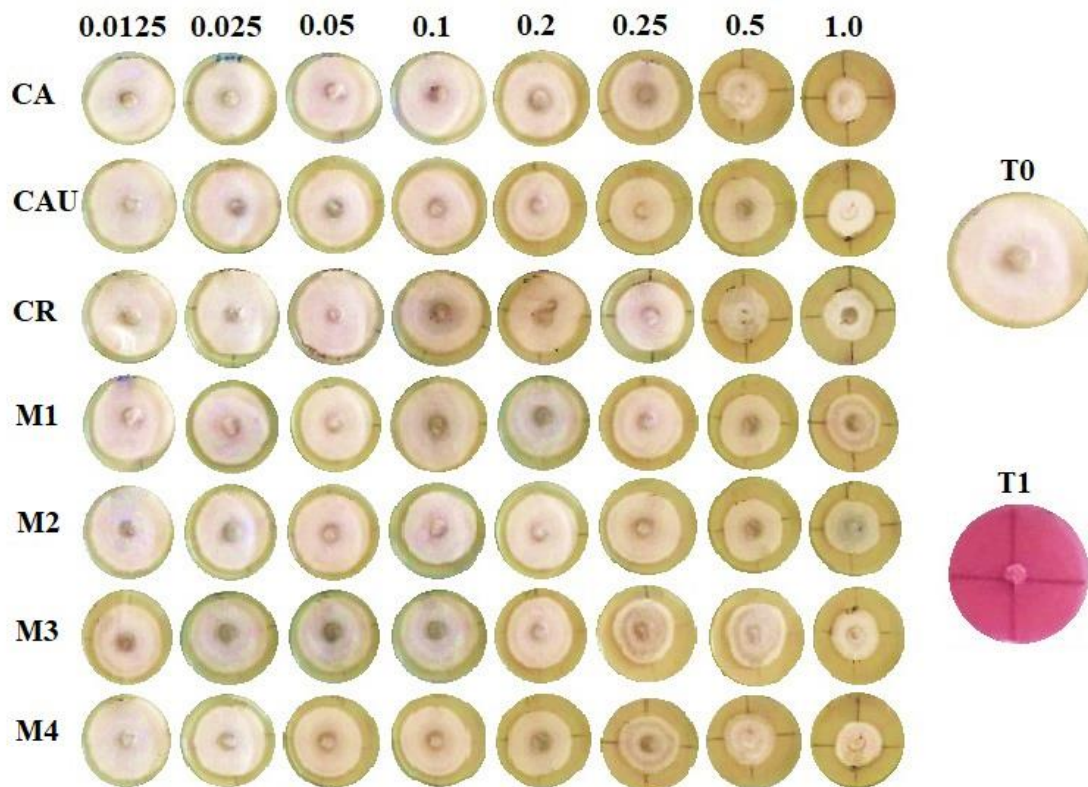
Utilizou-se a estatística não-paramétrica devido à ausência de variância nos resultados de alguns tratamentos. Foram consideradas significantes as diferenças com valor de probabilidade de erro abaixo de 5%. As análises foram realizadas nos programas Past 3.12 (Hammer *et al.*, 2001) e Sisvar 5.6 (Ferreira, 2019).

3. Resultados e Discussão

3.1. Inibição do crescimento e velocidade de crescimento micelial

Todas as concentrações dos óleos essenciais e das misturas reduziram o crescimento micelial e a velocidade de crescimento de *Colletotrichum gloeosporioides* quando comparados à testemunha negativa (Figura 1). As porcentagens de inibição aumentaram de forma significativa com o aumento das concentrações (Figura 2). As maiores inibições foram obtidas ao utilizar o óleo essencial de limão puro na maior concentração testada (1,0%) alcançando um valor médio de 67,7%, seguidos dos óleos essenciais puros de laranja e tangerina, com inibições médias de 56,1 e 55,9, respectivamente. As associações proporcionaram um efeito inibitório inferior quando comparados aos óleos testados isoladamente.

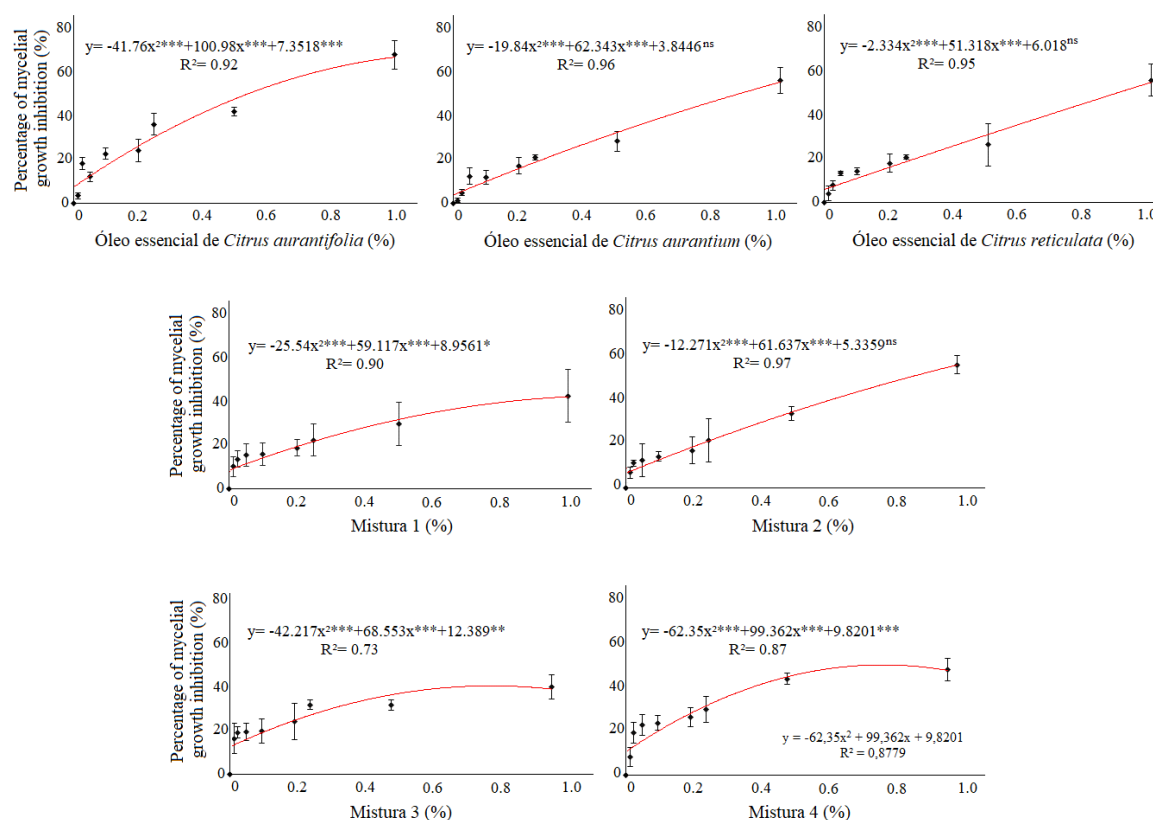
Figura 1. Comparação do crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* sob diferentes tratamentos.



CA: Óleo essencial de *Citrus aurantifolia*; **CAU:** Óleo essencial de *Citrus aurantium*; **CR:** Óleo essencial de *Citrus reticulata*; **M1:** Mistura 1 (25% limão + 50% laranja + 25% tangerina); **M2:** Mistura 2 (25% limão + 25% laranja + 50% tangerina); **M3:** Mistura 3 (50% limão + 25% laranja + 25% tangerina); **M4:** Mistura 4 (33,33% limão + 33,33% laranja + 33,34% tangerina); **T0:** Controle negativo (sem suplementação); **T1:** Controle positivo (1 ml L⁻¹ de Thiram); **0.0125 a 1.0:** Concentrações dos óleos essenciais isolados ou em mistura (%).

Fonte: Autores.

Figura 2. Efeito das diferentes concentrações de óleos essenciais de *Citrus* e misturas sobre o crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*. A linha vermelha mostra a direção do efeito estimado pela regressão quadrática.



*: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$; ***: $P < 0,001$; ns: Não significativo

CA: Óleo essencial de *Citrus aurantifolia*; **CAU:** Óleo essencial de *Citrus aurantium*; **CR:** Óleo essencial de *Citrus reticulata*; **M1:** Mistura 1 (25% limão + 50% laranja + 25% tangerina); **M2:** Mistura 2 (25% limão + 25% laranja + 50% tangerina); **M3:** Mistura 3 (50% limão + 25% laranja + 25% tangerina); **M4:** Mistura 4 (33,33% limão + 33,33% laranja + 33,34% tangerina).

Fonte: Autores.

As equações geradas pelas regressões utilizando o modelo quadrático permitiram o cálculo das inibições máximas estimadas e as concentrações necessárias para os diferentes óleos essenciais e suas misturas (Tabela 1). A estimativa sugeriu que, utilizando-se os óleos essenciais isolados, o potencial inibitório poderia ser elevado em concentrações acima de 1,0%. Utilizando o óleo essencial de tangerina na concentração de 2,01%, por exemplo, o crescimento micelial de *C. gloeosporioides* seria totalmente inibido. Por outro lado, quanto às misturas, com exceção da mistura 2, não haveria potencialização do efeito inibitório se houvesse o aumento na concentração testada.

Tabela 1. Inibições máximas observadas e estimadas de óleos essenciais de *citrus* e misturas sobre o crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*.

Tratamentos	Inibição máxima observada (%) *	Inibição máxima estimada (%)	Concentração necessária (%)
<i>Citrus aurantifolia</i>	67.6	68.4	1.20
<i>Citrus aurantium</i>	56.1	93,4	2.87
<i>Citrus reticulata</i>	55.9	100	2.01
Mistura 1	42.9	43.2	1.15
Mistura 2	54.8	82.7	2.51
Mistura 3	36.3	40.2	0.81
Mistura 4	47.1	49.4	0.79

*Valores de inibição obtidos na concentração máxima testada (1,0%).

Fonte: Autores.

De forma inversamente proporcional, a velocidade de crescimento diminuiu à medida que as concentrações dos óleos e associações aumentaram. Os valores diferiram significativamente do controle negativo que apresentou a maior velocidade de crescimento. (Tabela 2).

Tabela 2. Média dos índices de velocidade de crescimento micelial (cm dia⁻¹ ± DP) de *Colletotrichum gloeosporioides* na concentração de 1,0% dos óleos essenciais e misturas e nos tratamentos controle.

Tratamento	Velocidade de crescimento
Controle negativo	0,83 ± 0,02 a
<i>Citrus aurantifolia</i>	0,27 ± 0,05 d
<i>Citrus aurantium</i>	0,36 ± 0,04 c
<i>Citrus reticulata</i>	0,36 ± 0,06 c
Mistura 1	0,47 ± 0,09 b
Mistura 2	0,37 ± 0,03 c
Mistura 3	0,50 ± 0,04 b
Mistura 4	0,44 ± 0,03 b
Controle positivo	0,00 ± 0,00 e

Letras iguais na horizontal não diferem significativamente de acordo com teste de Mann-Whitney ($p > 0,05$).

Fonte: Autores.

As porcentagens de inibição (PIC) e velocidades de crescimento micelial (IVCM) diferiram significativamente entre as concentrações de óleos essenciais e misturas (Tabela 2), havendo interação significativa entre as fontes de variação. Em todas as situações, foi observado um efeito dose-dependente, ou seja, houve aumento do efeito inibitório com o aumento da concentração. No entanto, o aumento das concentrações foi mais eficiente quando se utilizou óleos isolados e a mistura 2.

Tabela 2. Análise de variância associada à porcentagem de inibição de crescimento (PIC) e velocidade de crescimento micelial (IVCM) entre os tratamentos sobre *Colletotrichum gloeosporioides*.

Porcentagem de Inibição de Crescimento Micelial (PIC)					
Fontes de variação	Soma dos quadrados	df	Quadrado médio	F	p-valor
Óleos	2543,53	6	423,922	17,13	1,37E-16
Concentrações	64304,4	8	8038,05	324,7	4,96E-128
Interação	9837,42	48	204,946	8,279	1,38E-30
Total	82923,4	314			

Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM)					
Fontes de variação	Soma dos quadrados	df	Quadrado médio	F	p-valor
Óleos	0,171157	6	0,02826	17,08	1,51E-16
Concentrações	4,39286	8	0,549107	328,7	1,21E-128
Interação	0,671654	48	0,013993	8,377	6,16E-31
Total	5,65659	314			

Fonte: Autores.

Os resultados obtidos no presente estudo evidenciam um efeito antifúngico significativo de óleos essenciais de espécies de *citrus* sobre o crescimento micelial de *C. gloeosporioides*. De acordo com a literatura, o limoneno, um monoterpeno cíclico, é o componente majoritário do óleo essencial obtido a partir das cascas de frutas cítricas (Cai *et al.*, 2019). A sua atividade antifúngica pode ser atribuída à inibição da pectinametilesterase (PME), que modifica o grau de metilesterificação das pectinas que são os principais componentes das paredes celulares dos fungos (Marei *et al.*, 2012). A perturbação da integridade da parede celular e permeabilidade da membrana celular promovem a perda de moléculas essenciais e causam danos irreversíveis à parede e membrana celular dos fungos (Cai *et al.*, 2019).

Em razão da alta complexidade química dos óleos essenciais, o efeito antimicrobiano é atribuído muitas vezes ao sinergismo ou antagonismo entre seus constituintes (Russo *et al.*, 2013). A utilização de misturas promoveu um efeito inferior ao obtido ao testar os óleos isoladamente, o que leva os autores a sugerirem que a interação entre os constituintes químicos presentes nos diferentes óleos que compuseram as misturas pode ter interagido de forma antagonica e atenuado o seu potencial antimicrobiano.

Utilizando o óleo essencial de espécies de *citrus* em concentrações próximas aos adotados nesse estudo, diferentes autores obtiveram valores significativos de inibição. Por exemplo, avaliando o potencial antifúngico do óleo essencial de *C. aurantium*, Metoui *et al.*

(2015) obtiveram inibições no crescimento de *Fusarium* spp., *Botrytis cinerea* e *Bipolaris sorokiniana* variando de 38 a 84% nas concentrações de 0,2 e 0,4 $\mu\text{L mL}^{-1}$ (0,2 e 0,4%). No controle de *A. alternata* e *Fusarium oxysporum*, Gomes *et al.* (2013) obtiveram a inibição total de crescimento utilizando o óleo essencial de *C. aurantifolia* na concentração de 2.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Enquanto, Chutia *et al.* (2009), obtiveram inibição total do crescimento de *A. alternata*, *Rhizoctonia solani*, *F. oxysporum*, *Helminthosporium oryzae* e *Cochliobolus lunatus*, ao utilizarem o óleo de *C. reticulata* na concentração de 0,2%.

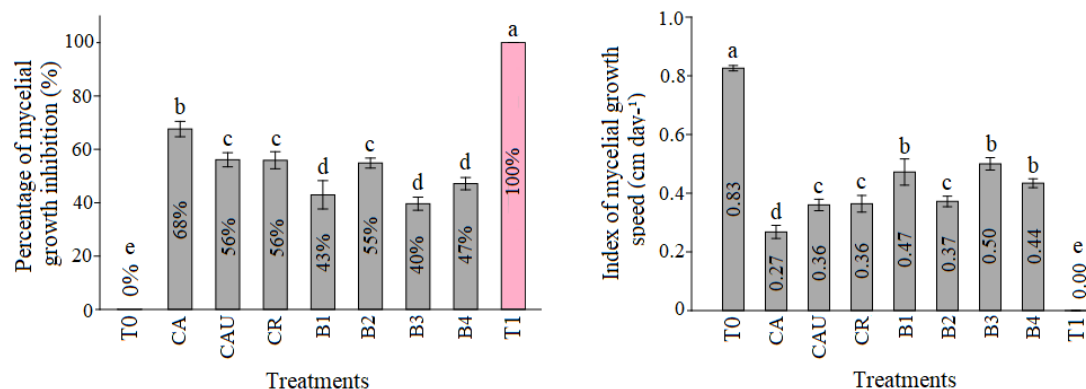
No controle de *Colletotrichum gloeosporioides*, óleos essenciais de outras espécies vegetais promoveram efeito antifúngico semelhantes aos obtidos no presente estudo. Por exemplo, o óleo essencial de aroeira da praia (*Schinus terebinthifolius*) inibiu 79% do crescimento micelial na concentração de 0,5% (Oliveira Júnior *et al.*, 2013). Enquanto o óleo de copaíba (*Copaifera* sp.) na concentração de 1,0% inibiu o crescimento do fungo em 49,5% (Sousa *et al.*, 2012).

De maneira geral, os óleos essenciais podem exercer atividade antimicrobiana sobre uma ampla gama de microrganismos. No entanto, para a obtenção de um efeito expressivo, as concentrações necessárias variam de acordo com o patógeno estudado. Além disso, o efeito antifúngico depende diretamente da composição química do óleo que tem influência direta sobre a sua atividade biológica, e da sensibilidade dos microrganismos avaliados a estes componentes (Antunes & Cavaco, 2010).

3.2. Comparação dos óleos essenciais e associações com o fungicida comercial

Para determinar a possível aplicação antifúngica dos óleos essenciais de *citrus* e associações no controle de *C. gloeosporioides*, o efeito fungitóxico obtido pelos tratamentos na maior concentração testada (1,0%) foi comparado ao obtido por um fungicida sintético comercial (Tiram). A inibição obtida pelos óleos essenciais e misturas foi inferior à obtida pelo fungicida comercial (Figura 4), sugerindo que em condições *in vitro* os óleos essenciais testados não são capazes de substituir completamente o uso desse produto.

Figure 4. Inibição do crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* em diferentes tratamentos.



CA: Óleo essencial de *Citrus aurantifolia*; **CAU:** Óleo essencial de *Citrus aurantium*; **CR:** Óleo essencial de *Citrus reticulata*; **M1:** Mistura 1 (25% limão + 50% laranja + 25% tangerina); **M2:** Mistura 2 (25% limão + 25% laranja + 50% tangerina); **M3:** Mistura 3 (50% limão + 25% laranja + 25% tangerina); **M4:** Mistura 4 (33,33% limão + 33,33% laranja + 33,34% tangerina); **T0:** Controle negativo (sem suplementação); **T1:** Controle positivo (1 ml L⁻¹ de Thiram);

Fonte: Autores.

Por outro lado, uma importante vantagem da utilização dos óleos essenciais no controle de fitopatógenos, é que em função da sua complexidade química, o efeito inibitório é resultado da associação de múltiplos mecanismos de ação que atuam sobre vários alvos ao mesmo tempo (Hoyos *et al.*, 2012). Os fungicidas sintéticos, por outro lado, geralmente possuem um único alvo de atuação (Bebber & Gurr, 2015). As variadas vias utilizadas para inibir o crescimento dos fungos dificulta o surgimento de resistência microbiana (Feng & Zheng, 2007).

No presente estudo, a utilização de óleos essenciais de espécies de *citrus* promoveu inibições significativas sobre crescimento micelial de *C. gloeosporioides*. A utilização desses óleos essenciais de maneira integrada à outras técnicas de manejo podem reduzir os impactos ambientais gerados pelo uso exclusivo de defensivos químicos.

Apesar dos resultados promissores obtidos no presente estudo, sugere-se a realização de estudos futuros abordando o controle *in vivo* de *C. gloeosporioides* com formulações à base da mistura desses óleos, pois o efeito em condições de campo pode diferir de forma considerável ao que foi obtido nos testes *in vitro*. Recomendamos o estudo do efeito desses tratamentos sobre culturas de importância econômica e que sejam estabelecidas concentrações seguras do produto.

4. Conclusão

Os óleos essenciais de limão Thaiti (*Citrus aurantifolia*), laranja doce (*Citrus aurantium*) e tangerina (*Citrus reticulata*), utilizados isoladamente, possuem atividade antifúngica sobre *Colletotrichum gloeosporioides*, mostrando-se promissores no controle deste fitopatógeno em condições *in vitro*. A concentração de 1,0% promoveu o maior efeito inibitório. Por outro lado, as misturas destes óleos nas proporções testadas neste estudo apresentaram baixo potencial antifúngico.

Referências

- Ahmad, M. M., Rehman, S., Iqbal, Z., Anjum, F. M., Sultan, J. I. Genetic variability to essential oil composition in four citrus fruit species. (2006). *Pakistan Journal of Botany*, 38(2), 319-324.
- Aloui, H., Kwaldia, K., Licciardello, F., Mazzaglia, A., Muratore, G., Hamdi, M., Restuccia, C. (2014). Efficacy of the combined application of chitosan and Locust Bean Gum with different citrus essential oils to control postharvest spoilage caused by *Aspergillus flavus* in dates. *International Journal of Food Microbiology*, 170, 21-28.
- Antunes, M. D. C., Cavaco, A. M. (2010). The use of essential oils for postharvest decay control. A review. *Flavour and Fragrance Journal*, 25, 351-366.
- Barbosa, M. S., Vieira, G.H.C., Teixeira, A. V. (2015). Atividade biológica *in vitro* de própolis e óleos essenciais sobre o fungo *Colletotrichum musae* isolado de bananeira (*Musa* spp.). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 17(2), 254-261.
- Bastos, C.N. (1997) Efeito do óleo de *Piper aduncum* sobre *Crinipelis perniciosa* e outros fungos fitopatogênicos. *Fitopatologia Brasileira*, 22(3), 441-443.
- Bebber, D. P., Gurr, S. J. (2015) Crop-destroying fungal and oomycete pathogens challenge food security. *Fungal Genetics and Biology*, 74, 62-64.
- Brand, S. C. Isolamento e identificação de substâncias provenientes da laranjeira “Valência” (*Citrus sinensis*) envolvidas no estímulo e/ou quebra da dormência de estruturas quiescentes de

Colletotrichum acutatum, agente causal da podridão floral dos citros. (2012). 104f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

Cai, R., Hu, M., Zhang, C., Niu, C., Yue, T., Yuan, Y., Whang, Z. (2019). Antifungal activity and mechanism of citral, limonene and eugenol against *Zygosaccharomyces rouxii*. *LWT - Food Science and Technology*, 106, 50-56.

Castellani, A. (1967). Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. Further Researches. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 70, 181-84.

Chee, Y. H., Kim, H., Lee, M. H. (2009) *In vitro* antifungal activity of limonene against *Trichophyton rubrum*. *Mycobiology*, 37(3), 243-246.

Choi, H., Song, H. S., Ukeda, H., Sawamura, M. (2000). Radical-Scavenging activities of Citrus essential oil and their components: Detection using 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 4156-4161.

Chutia, M., Deka Bhuyan, P., Pathak, M.G., Sarma, T.C., Boruah, P. (2009). Antifungal activity and chemical composition of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against phytopathogens from North East India. *LWT – Food Science and Technology*, 42(3), 777-780.

Dean, R., Van Kan, J. A. L., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., Rudd, J. J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., Foster, G. D. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13(4), 414-430.

Feng, W., Zheng, X. (2007). Essential oils to control *Alternaria alternata* *in vitro* and *in vivo*. *Food Control*, 18, 1126-1130.

Ferreira, D. F. (2019). Sisvar: A computer analysis system to fixed effects split plot type designs. *Revista Brasileira de Biometria*, 37(4), 529-535.

Gadelha, J. C. Controle preventivo e curativo da podridão pós-colheita de frutos de melão com produto alternativo. (2002). 37f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal do Ceará, 2002.

Gomes, M. S., Cardoso, M. G., Souza, P. E., Machado, S. M. F., Silva, L. F., Teixeira, M. L., Andrade, J., Miranda, C. A. S. F., Andrade, M. A. (2013). Multivariate analysis of the essential oil components of the genus *Citrus* and their antifungal activity. *Científica*, 41(2), 111-121.

Guimarães, L. G. L., Cardoso, M. G., Sousa, P. E., Andrade, J., Vieira, S. S. (2011). Antioxidant and fungitoxic activities of the lemongrass essential oil and citral. *Revista Ciência Agronômica*, 42(2), 464-472.

Hammer, O., Harper, D. A. T., Ryan, P. D. (2001). Past: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Paleontologia Electronica*. 4(1), 9.

Hoyos, J. M. A., Alves, E., Rozwalka, L. C., Souza, A. S., Zeviani, W. M. (2012). Antifungal activity and ultrastructural alterations in *Pseudocercospora griseola* treated with essential oils. *Ciência e Agrotecnologia*, 36(3), 270-284.

Lima, N. B., Lima, W. G., Tovar-Pedraza, J. M., Michereff, S. J., Câmara, M. P. S. (2015). Comparative epidemiology of *Colletotrichum* species from in northeastern Brasil. *European Journal of Plant Pathology*, 141, 679-688;

Lima, J. R., Gonçalves, L. R. B., Brandão, L. R., Rosa, C. A., Viana, F. M. P. (2012). Isolation, identification and activity *in vitro* of killer yeasts against *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from tropical fruits. *Journal of Basic Microbiology*, 52, 1-10.

Mahato, N., Sharma, K., Sinha, M., Cho, M. H. (2018). Citrus waste derived nutraceuticals for health benefits: Current trends and future perspectives. *Journal of Functional Foods*, 40, 307-316.

Marei, G. I. K., Rasoul, M. A. A., Abdelgalei, L. (2012). Comparative antifungal activities and biochemical effects of monoterpenes on plant pathogenic fungi. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 103, 56-61.

Metoui, N., Gargouri, S., Amri, I., Fezzani, T., Jamoussi, B., Hamrouni, L. (2015). Activity antifungal of the essential oils; aqueous and ethanol extracts from *Citrus aurantium* L. *Natural Product Research*, 29(23), 2238-2241.

Njoroge, S. M., Mungai, H. N., Koaze, H., Phi, N. T. L., Swamura, M. (2006). Volatile constituents of mandarin *Citrus reticulata* Blanco peel oil from Burundi. *Journal of Essential Oil Research*, 18, 659-662.

Okwi, D. E., Emenike, I. N. (2006). Evaluation of the phytonutrients and vitamins contents of *Citrus* fruits. *International Journal of Molecular Medicine and Advance Sciences*, 2(1),1-6.

Oliveira Junior, L. F. G., Santos, R. B., Reis, F. O., Matsumoto, S. T., Bispo, W. M. S., Machado, L. P., Oliveira, L. F. M. (2013). Efeito fungitóxico do óleo essencial de aroeira da praia (*Schinus terebinthifolius* RADDI) sobre *Colletotrichum gloeosporioides*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 15(1), 150-157.

Oliveira, J. A. Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativas* L.) e pimentão (*Capsicum annum* L.). (1991). 111 f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, 1991.

Patil, J. R., Chidambaba Murthy, K. N., Jayaprakasha, G. K., Chetti, M. B., Patil, B. S. (2009). Bioactive Compounds from Mexican Lime (*Citrus aurantifolia*) juice induce apoptosis in human pancreatic cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, Easton*, 57, 10933-10942.

Pegg, K. G., Coates, L. M., Korsten, L. Harding, R. M. (2002). Foliar, fruit and soilborne diseases. In: *The Avocado: Botany, Production and Uses*. Wiley A. W., Schaffer B. and Wolstenholme B. N. (eds): CAB International, Wallingford, UK, 299-338.

Pereira F. D. Caracterização morfocultural e molecular de isolados de *Colletotrichum* spp. provenientes de diferentes frutas tropicais. (2016). 119f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Unesp, Jaboticabal, 2016.

Pereira, M. C., Vilela, G. R., Costa, L. M. A. S., Silva, R. F., Fernandes, A. F., Fonseca, E. W. N., Piccoli, R. H. (2006). Inibição do desenvolvimento fúngico através da utilização de óleos essenciais de condimentos. *Ciência e Agrotecnologia*, 30(4), 731-738.

Piccinin, E., Pascholati, S. F., Di Piero, R. M., Benato, E. A. Doenças do abacateiro. (2016). In: Amorim, L., Rezende, J. A. M., Bergamin Filho, A., Camargo, L. E. A. *Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas*. (5a ed.), São Paulo: Ceres, 2, 1-7.

Rodrigues, A. A., Neto, E. B., Coelho, R. S. (2006). Indução de resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* em caupi: Eficiência de indutores abióticos e atividade enzimática elicitada. *Fitopatologia Brasileira*, 31(5), 492-499.

Russo, M., Suraci, F., Postorino, S., Serra, D., Roccotelli, A., Agosteo, G. E. (2013). Essential oil chemical composition and antifungal effects on *Sclerotium cepivorum* of *Thymus capitatus* wild populations from Calabria, southern Italy. *Revista Brasileira de Farmacognisia*, 23(2), 239-248.

Sharma, K., Mahato, N., Cho, M. H., Lee, Y. R. (2017). Converting citrus wastes into value-added products: Economic and environmentally friendly approaches. *Nutrition*, 34, 29-46.

Siskos, E. P., Mazomenos, B.E., Konstantopoulou, M. A. (2008). Isolation and identification of insecticidal components from *Citrus aurantium* fruit peel extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, Easton*, 56(14), 5577-5581.

Sousa, R. M. S., Serra, I. M. R. S., Melo, T. A. (2012). Efeito de óleos essenciais como alternativa no controle de *Colletotrichum gloeosporioides*, em pimenta. *Summa Phytopathologica*, 38(1), 42-47.

Vitoratos, A., Bilalis, D., Karkanis, A., Efthimiadou, A. (2013). Antifungal activity of plant essential oils against *Botrytis cinerea*, *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum*. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici*, 41(1), 86-92.

Porcentagem de contribuição de cada autor no manuscrito

Plínio Tércio Medeiros de Azevedo – 30%

Kevison Romulo da Silva França – 30%

Yaroslávia Ferreira Paiva – 10%

Tiago Augusto Lima Cardoso – 15%

Everton Vieira da Silva – 15%