



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA AGROALIMENTAR  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SISTEMAS AGROINDUSTRIAIS**

**PLÍNIO TÉRCIO MEDEIROS DE AZEVEDO**

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE CITRUS  
E ASSOCIAÇÕES SOBRE *Colletotrichum gloeosporioides***

**POMBAL, PARAÍBA  
2020**

PLÍNIO TÉRCO MEDEIROS DE AZEVEDO

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE CITRUS  
E ASSOCIAÇÕES SOBRE *Colletotrichum gloeosporioides***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sistemas Agroindustriais PPGSA, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre pela Universidade Federal de Campina Grande – UFCG/CCTA

**ORIENTADORES: D. Sc. EVERTON VIEIRA DA SILVA  
D. Sc. TIAGO AUGUSTO LIMA CARDOSO**

**Pombal, Paraíba  
2020**

A994a Azevedo, Plínio Tércio Medeiros de.

Atividade antifúngica de óleos essenciais de Citrus e associações sobre *Colletotrichum gloeosporioides*/ Plínio Tércio Medeiros de Azevedo. – Pombal, 2020.

56 f. : il. color.

Dissertação (Mestrado em Sistemas Agroindustriais) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia Agroalimentar, 2020.

“Orientação: Prof. Dr. Everton Vieira da Silva”.

“Coorientação: Prof. Dr. Tiago Augusto Lima Cardoso”.

Referências.

1. Óleos essenciais. 2. Limão Thai. 3. Laranja doce. 4. Tangerina. 5. Controle alternativo. 6. Crescimento micelial. 7. Fungitoxidade. 8. Fungos fitopatogênicos. I. Silva, Everton Vieira da. II. Cardoso, Tiago Augusto Lima. III. Título.

CDU 665.5(043)

PLÍNIO TÉRCIO MEDEIROS DE AZEVEDO

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE *CITRUS*  
E ASSOCIAÇÕES SOBRE *Colletotrichum gloeosporioides***

Aprovado em 19 de novembro de 2020.

**BANCA EXAMINADORA**



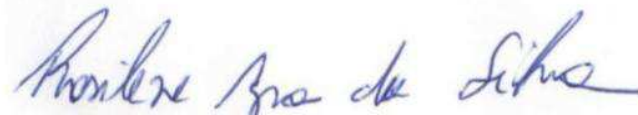
---

**Prof. D. Sc. Everton Vieira da Silva**  
PPGSA/UFCG



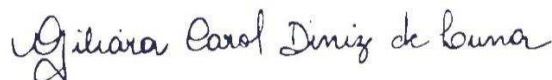
---

**Prof. D. Sc. Tiago Augusto Lima Cardoso**  
PPGSA/UFCG



---

**Prof<sup>a</sup>. D. Sc. Rosilene Agra da Silva**  
PPGSA/UFCG



---

**Prof<sup>a</sup>. D. Sc. Giliara Carol Diniz Gomes de Luna**  
ETSC/CFP/UFCG

## 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 7x8+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%) e uma testemunha positiva (fungicida comercial Thiram na concentração recomendada pelo fabricante - 1 mL L<sup>-1</sup>) 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<sup>-1</sup> ), 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.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	8
2. OBJETIVOS .....	10
2.1. OBJETIVO GERAL .....	10
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	10
3. REVISÃO DE LITERATURA .....	11
3.1. CITRICULTURA NO BRASIL E CARACTERÍSTICAS AGRONÔMICAS DA LARANJA, LIMÃO E TANGERINA .....	11
3.2. ÓLEOS ESSENCIAIS DE PLANTAS CÍTRICAS: OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E AÇÃO ANTIFÚNGICA .....	13
3.2.1 ÓLEO ESSENCIAL DE LIMÃO .....	15
3.2.2 ÓLEO ESSENCIAL DE LARANJA .....	15
3.2.3 ÓLEO ESSENCIAL DE TANGERINA .....	16
3.3. ÓLEOS ESSENCIAIS COMO TRATAMENTO ALTERNATIVO .....	17
3.4. DETERIORAÇÃO FÚNGICA NA PRODUÇÃO AGRÍCOLA: A AÇÃO DO <i>Colletotrichum gloesporioides</i> .....	18
3.5. PESQUISAS COM AGENTES ANTIFÚNGICOS .....	19
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	21
4.1. OBTENÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS E PREPARAÇÃO DE BLENDS .....	21
4.2. OBTENÇÃO DO ISOLADO FÚNGICO .....	21
4.3. LOCAL DO EXPERIMENTO .....	21
4.4. TRATAMENTOS E PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL .....	21
4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	22
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	23
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	39
REFERÊNCIAS .....	40

## 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; KIM; LEE, 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 e 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; BEBBER; GURR, 2015; PICCINI et al. 2016; RODRIGUES, 2019).

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 *Alternaria 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. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GERAL**

Avaliar o potencial fungitóxico de óleos essenciais de Limão Thaiti, Laranja Doce e Tangerina e suas associações frente ao fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides*.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Formular misturas dos óleos essenciais em diferentes proporções;
- Testar o efeito de diferentes concentrações dos óleos essenciais e misturas na inibição do *Colletotrichum gloeosporioides*;
- Determinar a porcentagem de inibição de crescimento micelial e o índice de velocidade de crescimento micelial da espécie frente os óleos e misturas aplicados.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. CITRICULTURA NO BRASIL E CARACTERÍSTICAS AGRONÔMICAS DA LARANJA, LIMÃO E TANGERINA

As plantas cítricas de origem asiática foram trazidas pelos colonizadores, aportando provavelmente no estado da Bahia. No entanto, como as plantas apresentaram melhores condições de desenvolvimento do que nas regiões de origem, as citrinas expandiram-se por todo o território nacional (LOPES *et al.*, 2011). Pertencentes à família da *Rutaceae*, as frutas dos gêneros *Citrus* fazem parte das frutas mais disseminadas no mundo inteiro, incluindo toranjas, laranjas, limas, tangerinas, mandarinas e limões (SHARMA *et al.*, 2017).

Devido as suas propriedades nutricionais e medicinais, as citrinas são conhecidas por serem boas fontes de vitaminas, minerais, fibras e compostos bioativos, como carotenoides, alcaloides, flavonoides e polifenóis (OKWI; EMENIKE, 2006; MAHATO *et al.*, 2018). Estes fitonutrientes podem proporcionar ação antioxidante, antimicrobiana, anticancerígenas e anti-inflamatórias (GAO *et al.*, 2018).

Segundo Lorenzi *et al.* (2006), as laranjeiras são árvores de porte médio, atingindo 5,0 a 10,0 m de altura, e copa de formato esférico. As cultivares em cada um desses subgrupos diferenciam-se quanto à maturação, que pode ser precoce, meia-estação ou tardia, e ainda, quanto à coloração do endocarpo, que pode ser mais claro, mais alaranjado ou apresentar polpa vermelho intensa, devido à presença de antocianinas (BASTOS *et al.*, 2014).

O Brasil é o maior produtor de laranjas e o maior exportador de suco concentrado, possuindo uma área de plantação de aproximadamente 165 milhões de árvores. Desta forma, a produção de citrus tem sido de grande importância para o desenvolvimento do país, gerando empregos e elevando a posição na balança comercial, na qual entre os meses de janeiro a setembro de 2017 foi responsável pela criação de 45.009 novos postos de trabalho (IBGE, 2016; NEVES, 2017; OECD/FAO, 2016).

No patamar de produção de citrus, a tangerina brasileira ocupa a quinta posição dentro do cenário mundial, possuindo uma área cultivada maior que 50 mil hectares chegando a uma produção de aproximadamente 950 mil toneladas por ano, sendo as regiões Sul e Sudeste responsáveis por cerca de 86% da produção brasileira (FAO, 2016; IBGE, 2015; FAOSTAT, 2017).

De acordo com os dados de produção de mudas, Fundecitrus, Amaro e Baptistella (2010) mostraram que, no período de 2005 a 2009, as plantações de tangerina ocuparam entre 2 a 2,5% dos plantios de citrus, sendo que a variedade de tangerina Ponkan representava cerca de 50%, o tangor Murcott 30%, a mexerica do Rio 9%, a tangerina Cravo 5,5% e outras variedades não especificadas com 5,5%.

As tangerineiras são árvores de porte médio, com crescimento ereto, produtivas, mas com tendência a apresentarem alternância de produção. Os Frutos são grandes, apresentam maturação de meia-estação, com casca solta e sabor bastante doce, o que os torna muito apreciados para consumo *in natura*. Um dos principais entraves do seu cultivo é a suscetibilidade dessa cultivar à mancha-marrom-de-*Alternaria*, causada pelo fungo *Alternaria alternata* f.sp. *citri* (BASTOS *et al.*, 2014).

A espécie *Citrus aurantifolia* Tanaka (limão tahiti) é uma árvore de origem tropical com exploração econômica relativamente recente, seus frutos são considerados precoces, sendo relatado que a partir do terceiro ano possui uma produção de frutos significativa (MENDONÇA *et al.*, 2006). Essa espécie pode ser cultivada tanto em terras de areia como em argila, no entanto é muito sensível ao frio, às geadas e alta temperatura (VIANA, 2010).

Os subprodutos oriundos da citricultura representam um grande problema para o manejo ambiental, pois causam poluição devido a sua deterioração microbiana. Portanto, novas perspectivas a respeito destes subprodutos estão sendo explorados, como na produção de aditivos ou suplementos alimentares com alto valor econômico e nutricional (SAHRAOUI *et al.*, 2011).

Tanto no cultivo como nos processamentos dos citrus são gerados grandes volumes de resíduos. Por exemplo, no manejo dos pomares é realizada a remoção e descarte de parte dos frutos verdes para garantir uma melhor qualidade final (CHON e CHON, 1997). O resíduo do processamento de frutas cítricas é sólido gerado a partir da extração do suco, sendo 90% destes sólidos provenientes das indústrias de processamento de laranjas, constituído por casca (albedo e flavedo), pedaços de membranas, bagaço de polpa, vesículas de suco e sementes, totalizando de 44 a 50% do peso total da fruta (WIDMER *et al.*, 2010).

Estes subprodutos cítricos são considerados uma fonte valiosa de ingredientes funcionais, notadamente flavonoides, fibras alimentares e óleos essenciais (SENEVIRATHNE *et al.*, 2009). Além destas aplicações, a partir do exocarpo,

mesocarpo e endocarpo podem ser obtidos produtos como doces, aminoácidos e diversas vitaminas (principalmente a vitamina C) e, essências aromáticas (oleosa e aquosa) (TIENNE *et al.*, 2004).

Segundo Pelizer *et al.* (2007), os resíduos de frutos cítricos são uma rica fonte de flavonoides naturais, considerando a quantidade de resíduo gerado e a alta concentração desses compostos fenólicos. As cascas de citrinos podem ser exploradas por indústrias farmacêuticas e alimentícias (MA *et al.*, 2008). Apesar disso, os compostos presentes na casca de cítricos são, geralmente, processados na forma de subprodutos ou desperdiçados, resultando na poluição ambiental (MA *et al.*, 2008).

### **3.2. ÓLEOS ESSENCIAIS DE PLANTAS CÍTRICAS: OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E AÇÃO ANTIFÚNGICA**

Segundo a resolução – RDC nº 2, de 15 de janeiro de 2007, óleos essenciais são produtos de origem vegetal obtidos por processos físicos como a destilação por arraste com vapor de água, destilação a pressão reduzida ou por outro método adequado. Simões *et al.* (2010) designam óleos essenciais como líquidos voláteis com uma alta complexidade na sua estrutura, apresentando pouca solubilidade em água e solúveis em solventes orgânicos apolares como o éter.

Os óleos essenciais são extraídos de várias partes dos vegetais, pois ocorrem em diferentes órgãos das plantas aromáticas como nos caules (canela, carqueja, pau rosa), nas folhas (eucalipto, capim-limão, menta), sementes (noz moscada), flores (camomila, lavanda, laranja), frutos (erva-doce, funcho), raízes (vetiver) e rizomas (gingibre) (BIASI e DESCHAMPS, 2009).

A produção de óleo essencial está relacionada com a sobrevivência do vegetal na natureza, desempenhando o papel de defesa contra possíveis ameaças, como microrganismos, insetos e outros agentes (SIANI *et al.* 2000). Estes óleos possuem substâncias biologicamente ativas, o que chama atenção como matéria prima para indústria farmacêutica e de alimentos (SANTANA, 2013; RAUT; KARUPPAYIL, 2014).

Por outro lado, a sua porcentagem nas plantas é muito baixa, raramente passando dos 1%, com algumas exceções como o cravo e a noz-moscada, que podem chegar a mais de 10%. Além disso, as composições dos óleos essenciais gerados de diferentes vegetais

refletem o metabolismo de acordo com as condições ambientais, como solo, clima, altitude e luminosidade (CARVALHO *et al.*, 2006).

A maioria dos óleos essenciais são comercializados para fins terapêuticos devido sua qualidade aromática, contudo, nos últimos anos várias pesquisas foram iniciadas por indústrias devido as suas diversas propriedades funcionais e também pelo seu uso como conservante natural (GUTIERREZ; BARRY-RYAN; BOURKE, 2008; BERALDO *et al.*, 2013).

Os óleos essenciais de frutas cítricas são formados por hidrocarbonetos monoterpênicos, sesquiterpênicos e monoterpênicos oxigenados. Os óleos voláteis da casca do fruto e das folhas do limão são ricos em limoneno, b-pineno, g-terpinoleno, neral e geranial (GHELARDINI *et al.*, 1999; VEKIARI *et al.*, 2002).

Os óleos essenciais extraídos de casca das frutas cítricas apresentam uma grande quantidade de aplicações terapêuticas e industriais, sendo utilizados nas indústrias de cosméticos, farmacêutica, materiais de limpeza e na indústria de alimentos, como por exemplo, na produção de bebidas e balas, possuindo grande importância econômica (BOUSBIA *et al.* 2009).

A forma como esses óleos essenciais são extraídos vai depender de fatores como: o composto que se deseja obter; a localização do óleo na planta; e a quantidade do óleo (SIMÕES *et al.*, 2003). Cada método de extração é capaz de produzir diferentes tipos de extratos com composição química diferente a partir de uma mesma espécie vegetal (WOLFFENBUTTEL, 2010).

A composição do óleo essencial é determinada principalmente pelo genótipo da planta, podendo variar consideravelmente de espécie para espécie. Todavia, parâmetros climáticos e fatores agronômicos como fertilização, altitude, tipo de solo, época, data da colheita e o processo de destilação também afetam a composição e o teor do óleo obtido (KERROLA; GALAMBOSI; KALLIO, 1994; BORSATO *et al.*, 2008).

Segundo Lupe (2007), os principais métodos utilizados para extração de óleo essencial são os seguintes: (a) enfleuragem, utilizada para extrair o óleo essencial da pétala das flores; (b) arraste por vapor d'água, utilizado para extrair óleo de plantas frescas, sendo o método mais tradicional e o mais utilizado; (c) extração com solvente, através de solvente apolar, método pouco utilizado comercialmente; (d) prensagem, utilizado para extrair o óleo essencial de frutos cítricos; e (e) extração por dióxido de

carbono supercrítico, responsável por recuperar aromas essenciais de vários tipos e não somente o óleo essencial, sendo o método mais viável industrialmente.

Quando se trata da produção de óleos essenciais de frutas cítricas, o método mais utilizado para produção é a prensagem, no qual os frutos são submetidos a prensas hidráulicas, esmagando-os e produzindo assim, o suco e o óleo essencial. Posteriormente, o suco é separado do óleo essencial através de jatos d'água, formando uma emulsão, e logo em seguida são utilizadas diversas operações unitárias, como a decantação, centrifugação ou destilação fracionada para completa separação (LUPE, 2007).

### **3.2.1 ÓLEO ESSENCIAL DE LIMÃO**

O componente majoritário do óleo essencial de limão é o limoneno. O citral domina entre os aldeídos, o qual é responsável pelas propriedades aromáticas do óleo. Além destes compostos, podem ser encontrados: os monoterpenos ( $\alpha$ -tujeno,  $\alpha$  e  $\beta$ -pipeno, canfeno, mirceno,  $\alpha$  e  $\beta$ -felandreno,  $\alpha$  e  $\gamma$ -terpineno, terpinoleno,  $\beta$ -ocimeno, p-cimeno, 3-careno); monoterpenos oxigenados (hidrato de sabineno, linalol, endo-fenchol, cânfora, citrnelol, borneol, terinterpineol, nerol, neral, geraniol, geranial, citronelol); sesquiterpenos ( $\sigma$ -elemeno, E-caryphelleno,  $\alpha$ -trans-bergaboleno,  $\alpha$ -humuleno, E- $\beta$ -farneseno, curcumeno, valenceno, biciclogermacreno,  $\alpha$ -muroleno  $\alpha$  e bisaboeno); sesquiterpeno oxigenados (álcool carypheleno, germacreno,  $\alpha$ -muurolo,  $\alpha$ -cadinol,  $\alpha$ -bisabolol, E-farnesol) e outros compostos como o ácido palmítico e ácido linoleico (SILVA, 2009). No geral, o óleo essencial de limão é relatado com teor de 92 a 94% de hidrocarbonetos e 6 a 8% de compostos oxigenados (COELHO, 2000; LOTA *et al.*, 2002; FERHAT *et al.*, 2007; AZAMBUJA, 2012).

### **3.2.2 ÓLEO ESSENCIAL DE LARANJA**

Os óleos essenciais de frutas cítricas são encontrados em glândulas localizadas na superfície da casca, sendo o processo de extração mais comum a destilação por arraste a vapor e prensagem (SANTOS *et al.*, 2003).

As cascas das laranjas são prensadas para extrair o óleo, em seguida são realizados outros procedimentos para separação e obtenção do óleo puro, apresentando-se límpido, de cor amarela-escuro, com um cheiro forte característico e

amargo (MULLER, 2011).

O óleo essencial da casca da laranja é uma mistura complexa que pode chegar a 300 componentes químicos que se dividem em duas frações, a não volátil, formada por carotenoides, flavonoides e coumarinas; e a volátil composta por aldeídos, cetonas, hidrocarbonetos terpênicos, como o limoneno, mirceno, valenceno e linalol, álcoois e ésteres. A fração volátil corresponde de 94 a 96% do óleo total, podendo conter mais de 100 compostos em traços (SANTOS; SERAFINI; CASSEL, 2003).

Também presente no óleo essencial de laranja, o limoneno chega a cerca de 90% da composição do óleo, sendo o componente majoritário, seguido de 3% de mirceno, 1% de  $\alpha$ -pineno, 0,5% de sabineno, 0,2% de decanal, 0,4% de linalol e diversas outras substâncias contidas em menores proporções. No geral, o óleo essencial de laranja trata-se de um produto rico em monoterpenos, razão pela qual o óleo tende a deteriorar-se com o decorrer do tempo quando não armazenado da forma correta, resultando em um óleo rançoso (AZAMBUJA, 2012).

Os terpenos são metabólitos secundários de plantas, os quais são responsáveis pela defesa contra microrganismos e insetos (GERSHENZON E DUDAREVA, 2007), além de possuir diversas funções biológicas incluindo ação antiviral, anti-hiperglicêmica, anti-inflamatória e antiparasitária (PADUCH *et al.*, 2007).

Em estudos realizados por Ambrosio *et al.* (2017), o óleo essencial de laranja demonstrou atividade antibacteriana sobre bactérias patogênicas (*Salmonella Enteritidis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* e *Listeria innocua*) e atividades menores sobre bactérias benéficas (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus* e *Bacillus subtilis*). O óleo essencial de laranja possui efeitos antioxidante demonstrado em pesquisas *in vitro*, podendo reduzir espécies reativas de oxigênio de macrófagos alveolares ativadas (RANTZSCH *et al.*, 2009).

### 3.2.3 ÓLEO ESSENCIAL DE TANGERINA

O óleo essencial de tangerina possui diversas funções biológicas, dentre elas as propriedades antissépticas, antiespasmódicas, sedativas no tratamento de problemas digestivos e na diminuição do *stress*. Seus principais componentes são o  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, limoneno, citronelal, linalol,  $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$ -farneseno e o dodecanal (CUNHA *et al.*, 2012; JOHNSON *et al.*, 2013).

A atividade fungicida de óleos essenciais de frutas cítricas foi verificada em



uma grande quantidade de fungos pós-colheita, incluindo *Alternaria alternata*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Rhizopus stolonifer* e *Aspergillus spp.* (KUMAR et al., 2008; BOSQUEZ-MOLINA et al., 2010; DAFEREA et al., 2013; STEVIC et al., 2014).

### 3.3. ÓLEOS ESSENCIAIS COMO TRATAMENTO ALTERNATIVO

A extração de óleos essenciais dos resíduos de frutos do gênero *Citrus*, pode ser uma alternativa viável para agregar valor à um subproduto e conseqüentemente diminuir os efeitos negativos causados pelos resíduos gerados na indústria através da produção de óleos essenciais (REZZADORI; BENEDETTI; AMANTE, 2012; ZULIAN; DÖRR; ALMEIDA, 2013).

Diversas tecnologias estão sendo adotadas como alternativas aos defensivos químicos para o controle de doenças em plantas, como controle cultural, rotação de culturas, incorporação de matéria orgânica no solo, cultivo consorciado, plantio de espécies e variedades resistentes (CANDIDO SILVA; MELO, 2013), o uso de agentes de controle biológico (ŽIVKOVIĆ et al., 2010; AKILA et al., 2011; BONETT et al., 2013; ASHWINI; SRIVIDYA, 2014; YAN et al., 2014; CHE et al., 2015; THANGAVELU; GOPI, 2015), indução de resistência sistêmica (DEMARTELAERE et al., 2017) e o uso de extratos vegetais e óleos essenciais extraídos de plantas aromáticas (BASTOS; ALBUQUERQUE, 2004; CARNELOSSI et al., 2009).

O uso de óleos essenciais contra fungos fitopatogênicos foi descrito por diversos autores, como Rozwalka et al. (2008), que reportou a utilização de óleo essencial de cravo a 10% contra *Glomerella singulata* e *Colletotrichum gloeosporioides* em frutos de goiaba. Kishore, Pand e Harish (2007) avaliaram a atividade inibitória da germinação de esporos e constataram que óleo de canela, citral e óleo de cravo inibiram acima de 90% os fitopatógenos *Cercospora arachidicola*, *Phaeoisariopsis personata* e *Puccinia arachidis*, quando utilizado a 0,01% v/v. Os autores afirmam ainda que os óleos que apresentaram características antifúngicas atuam reduzindo o crescimento micelial e induzem a quebra e a evacuação citoplasmática em fungos.

A utilização destes compostos naturais contra fungos fitopatógenos surgem como uma alternativa menos agressiva ao meio ambiente (SILVA et al., 2017). Além de diminuir a dependência dos defensivos químicos, os métodos alternativos para o controle

de doenças em plantas têm como objetivo conciliar a produção de alimentos seguros, a preservação ambiental e a viabilidade econômica (FAROOQ *et al.*, 2011)

### **3.4. DETERIORAÇÃO FÚNGICA NA PRODUÇÃO AGRÍCOLA: A AÇÃO DO *Colletotrichum gloeosporioides***

Estima-se que em 2050 a população humana poderá alcançar 9,1 bilhões de habitantes (FAO, 2009). Tornando-se uma preocupação mundial, pois um dos aspectos mais importantes na produção de alimentos até a pós-colheita de produtos agrícolas são as perdas ocorridas antes ou depois do processamento, podendo chegar a 50% em algumas variedades de vegetais (RODRIGUES, 2006). As doenças ocasionadas por fungos são as principais responsáveis pelos prejuízos causados aos produtores, chegando a cerca de 90% do total (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

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).

A infecção inicia-se com um ou poucos patógenos específicos, seguida por uma enorme invasão de patógenos secundários que surgem após a infecção primária. Estes patógenos agridem os tecidos dos vegetais, aumentando de forma notável o dano provocado pela infecção inicial (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Fungos do gênero *Colletotrichum* estão listados entre os dez fungos fitopatogênicos mais importantes do mundo, tanto por sua relevância científica quanto pela importância econômica (DEAN *et al.*, 2012). Espécies de *Colletotrichum* infectam mais de 30 gênero de plantas (DAMM *et al.*, 2012a, b; FARR; ROSSMAN, 2017), causando antracnose e doenças pós-colheita em diversas culturas, como os cajueiros, mamoeiros, videiras, citrinos, abacateiros, mangueiras e goiabeiras (LOPEZ; LUCAS, 2010; UDAYANGA *et al.*, 2013; YAN *et al.*, 2015; AIELLO *et al.*, 2015; HUNUPOLAGAMA *et al.*, 2015).

Dentre as diversas espécies deste gênero, a espécie *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc destaca-se por ser um patógeno ubíquo e cosmopolita, infectando mono e dicotiledôneas (SHARMA; KULSRHESTHA, 2015),

sendo capaz de infectar pelo menos 1.000 espécies vegetais (PHOULIVONG *et al.*, 2010).

Nos frutos, as lesões de antracnose possuem diâmetro variável contendo uma massa de conídios de coloração alaranjada ou rósea, chamada de cirro, em seu interior (REIS *et al.*, 2009). Quando presente na semente, o fungo causa “*damping off*” de pré e pós-emergência, atingindo tecidos vegetais jovens, que ainda dependem das reservas das sementes (PAVAN *et al.*, 2016).

### 3.5 PESQUISAS COM AGENTES ANTIFÚNGICOS.

Alguns estudos comprovam que óleos essenciais e extratos vegetais são eficientes no combate a espécies do gênero *Colletotrichum*. Souza Júnior, Sales e Martins (2009) demonstraram que os óleos essenciais de *Lippia sidoides* e *Lippia citriodora* em concentrações entre 0,1 e 1,0 % são capazes de inibir *Colletotrichum gloeosporioides*.

O óleo essencial de Atroveran (*Ocimum selloi*) diminuiu a germinação de *Colletotrichum gloeosporioides* em 93% na concentração de 1.000 ppm (COSTA *et al.*, 2015). Os óleos essenciais de cidrão (*Lippia citriodora*), capim-santo (*Cymbopogon citratus*), alfavaca-cravo (*Ocimum gratissimum*), goiabeira vermelha (*Psidium guayava var. pomifera*) e alecrim-pimenta (*Lippia sidoides*) em concentrações entre 1 e 10 µL/mL, impossibilitam a germinação e desenvolvimento deste patógeno.

Marinelli *et al.* (2012) observaram atividade fungicida do óleo de melaleuca e verificaram inibição total do crescimento de *Colletotrichum gloeosporioides* na concentração de 0,46%. Freire *et al.* (2012) avaliaram o efeito do óleo de hortelã (*Mentha piperita*) no controle da mesma espécie citada acima e obtiveram inibição total na concentração de 0,2%.

A aplicação *in vitro* do óleo essencial de mastruz (*Chenopodium ambrosioides*) sobre o crescimento de *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum musae* e *Fusarium oxysporum* causou a total inibição dos fungos na concentração de 0,3% (JARDIM *et al.*, 2010). Avila-Sosa *et al.* (2008) verificaram a eficácia de extratos vegetais de *Baccharis salicifolia*, orégano mexicano (*Lippia berlandieri*) e marigold mexicana (*Tagetes lucida*) na inibição do crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*. Hossain *et al.* (2008) verificaram a ação antifúngica do óleo essencial

de chá de java (*Orthosiphon stamineus*) na concentração mínima entre 500 e 1000 ug/mL sobre *Colletotrichum. capsici*.

Estudos realizados por Asgar *et. al.* (2016) avaliaram a eficácia do óleo de gengibre e do extrato combinado com goma arábica no controle da antracnose em frutos de mamões. O óleo de gengibre combinado com a goma arábica inibiu a germinação dos conídios de *Colletotrichum gloeosporioides* em 93%. Rozwalka *et al.* (2008) avaliaram o extrato de gengibre (*Zingiber officinale*) e evidenciaram o potencial destes extratos utilizados, com efeito inibitório sobre o crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*.

Silva (2009) constatou total inibição do *Colletotrichum gloeosporioides* utilizando óleo essencial de copaíba, porém, os autores escolheram uma metodologia na qual distribui-se 100 µL do óleo na superfície da placa de Petri antes de adicionar o disco fúngico. Estudos realizados por Sousa *et al.* (2012) também relataram inibição no crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* utilizando o óleo de copaíba, obtendo diâmetro das colônias variando entre 6,36 cm a 0,20% do óleo e 4,54 cm a 1%.

O uso de óleos na agricultura pode ser relevante e com potencial de crescimento no cenário global de proteção de alimentos, podendo melhorar de forma quantitativa e qualitativa a produção de alimentos, além de permitir o acesso à uma alimentação adequada e saudável para todas as pessoas, no caminho rumo de uma efetiva segurança alimentar ( FISHER & PHILLIPS, 2008).

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. OBTENÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS E PREPARAÇÃO DE BLENDS**

Os óleos essenciais de limão Thaiti (*Citrus aurantifolia*), laranja doce (*Citrus aurantium*) e tangerina (*Citrus reticulata*) foram comprados em uma indústria especializada do setor. A partir dos óleos essenciais puros foram preparados quatro blends: Blend 1 (25% limão + 50% laranja + 25% tangerina); Blend 2 (25% limão + 25% laranja + 50% tangerina); Blend 3 (50% limão + 25% laranja + 25% tangerina); Blend 4 (33,33% limão + 33,33% laranja + 33,34% tangerina).

### **4.2. OBTENÇÃO DO ISOLADO FÚNGICO**

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).

### **4.3. LOCAL DO EXPERIMENTO**

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.

### **4.4. TRATAMENTOS E PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL**

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizados em esquema fatorial 7x8+2, sendo 7 formulações de óleos essenciais (3 óleos essenciais puros e 4 blends) 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<sup>-1</sup>) com 5 repetições cada.

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 1 cm (Ø) foram retirados das margens de uma cultura de 7 dias e transferidos ao centro de cada placa contendo os tratamentos. As placas foram 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):

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

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

#### 4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para verificar o efeito das concentrações das formulações sobre o crescimento do fungo, foram realizadas regressões quadráticas. O efeito das formulações dos óleos, concentrações e interação entre essas duas fontes de variação sobre o crescimento do fungo será verificada utilizando uma PERMANOVA de dois fatores (ANOVA com 9999 permutações). Para testar a diferença entre tratamentos com as formulações de óleos e tratamento com fungicida (testemunha positiva), foi utilizado o teste de Scott-Knott. Serão consideradas significantes as diferenças com valor de probabilidade abaixo de 5%. As análises foram realizadas nos programas Past 3.12 (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001) e R 3.5.1.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados desse estudo foram dispostos no formato de artigo científico a ser submetido junto ao periódico Research, Society and Development – ISSN 2525-3409.

### **Efeito de misturas de óleos essenciais de espécies de *citrus* no controle de *Colletotrichum gloeosporioides***

Plínio Tércio Medeiros de Azevedo; Kevison Romulo da Silva França; Tiago Augusto Lima Cardoso; Everton Vieira da Silva

**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 7x8+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<sup>-1</sup>) 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<sup>-1</sup> ), 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.

## 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; KIM; LEE, 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 e 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; BEBBER; GURR, 2015; PICCINI et al. 2016; RODRIGUES, 2019).

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 *Alternaria 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 Taiti, laranja doce, tangerina e diferentes misturas dos três óleos sobre o crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **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);

### **Tratamentos e delineamento experimental**

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 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<sup>-1</sup>) 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).

### **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  $27 \pm 2^\circ\text{C}$ .

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):

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

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

### **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; HARPER; RYAN, 2001) e Sisvar 5.6 (FERREIRA, 2019).

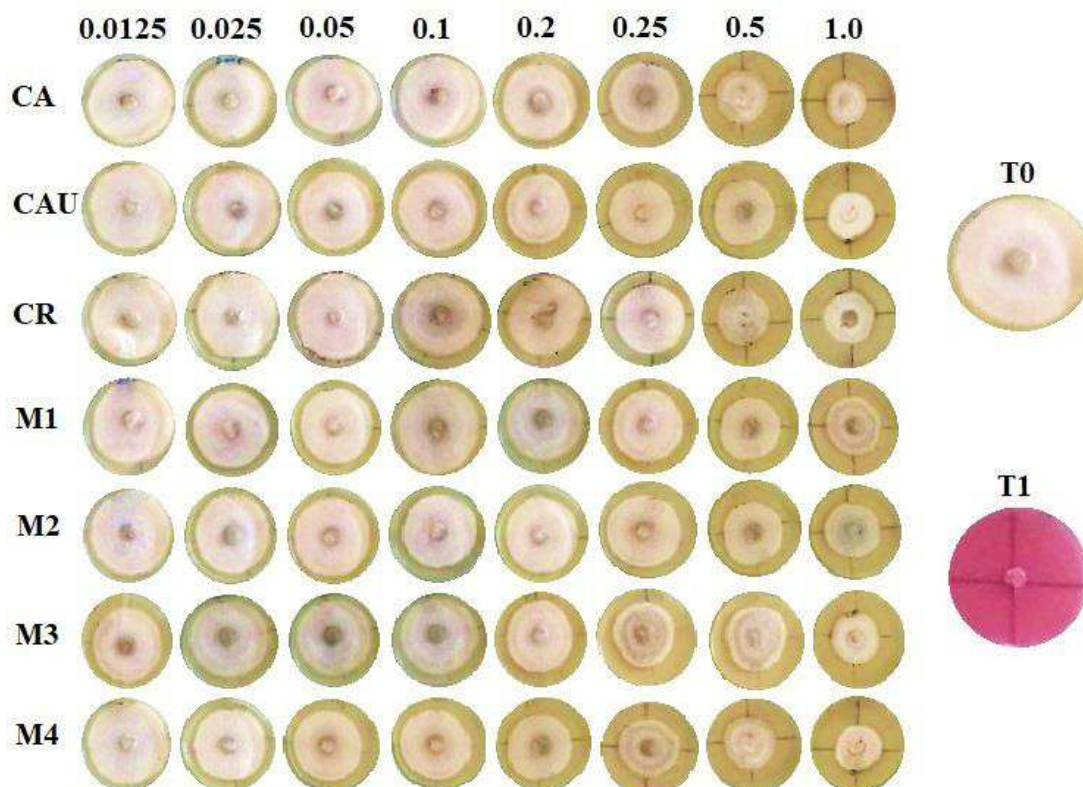
## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **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

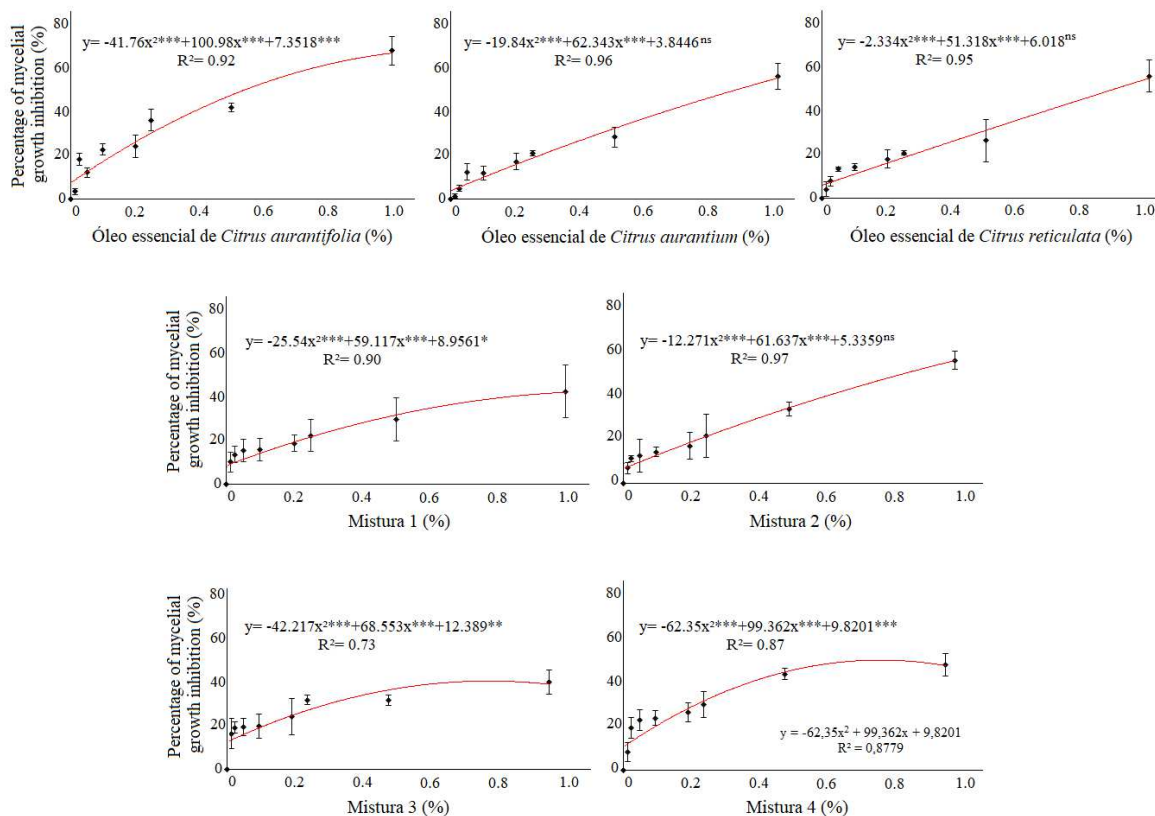
essenciais puros de laranja e tangerina, com inibições médias de 56,1 e 55,9, respectivamente. As associações proporcionaram um efeito inibitório inferior quando comparados aos óleos testados isoladamente.

**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<sup>-1</sup> de Thiram); **0.0125 a 1.0:** Concentrações dos óleos essenciais isolados ou em mistura (%).

**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);

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*.

	<b>Inibição máxima observada (%)*</b>	<b>Inibição máxima estimada (%)</b>	<b>Concentração necessária (%)</b>
<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%)

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 ( $\text{cm dia}^{-1} \pm \text{DP}$ ) de *Colletotrichum gloeosporioides* na concentração de 1,0% dos óleos essenciais e misturas e nos tratamentos controle.

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

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

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*.

<b>Percentage of Mycelial Growth Inhibition (PGI)</b>					
<b>Sources of Variation</b>	Sum of sqrs	df	Mean square	F	p-value
<b>Oils</b>	2543,53	6	423,922	17,13	1,37E-16
<b>Concentrations</b>	64304,4	8	8038,05	324,7	4,96E-128
<b>Interaction</b>	9837,42	48	204,946	8,279	1,38E-30
<b>Total</b>	82923,4	314			
<b>Index of Mycelial Growth Speed (IMGS)</b>					
<b>Sources of Variation</b>	Sum of sqrs	df	Mean square	F	p-value
<b>Oils</b>	0,171157	6	0,02826	17,08	1,51E-16
<b>Concentrations</b>	4,39286	8	0,549107	328,7	1,21E-128
<b>Interaction</b>	0,671654	48	0,013993	8,377	6,16E-31
<b>Total</b>	5,65659	314			

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 monoterpene 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 podem ter interagido de forma antagônica e atenuaram 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 *Alternaria 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 *Alternaria alternata*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium 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).

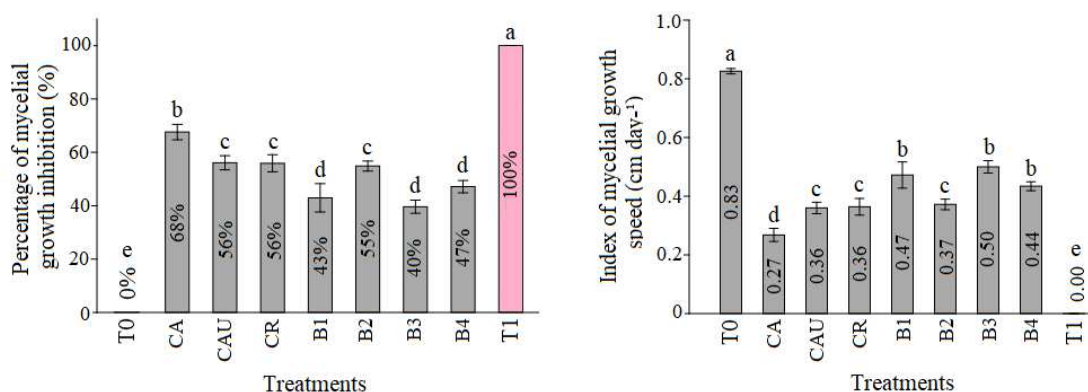
De maneira geral, os óleos essenciais podem exercer atividade antimicrobiana sobre uma ampla gama de microrganismos. No entanto, para a obtenção de um efeito expressivo, as concentrações necessárias variam de acordo com o patógeno estudado. Além disso, o efeito antifúngico depende diretamente da composição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

### **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<sup>-1</sup> de Thiram);

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.

## 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. **Pakistan Journal of Botany**, v.38, n.2, p.319-324, 2006.
- ALOUI, H.; KWALDIA, K.; LICCIARDELLO, F.; MAZZAGLIA, A.; MURATORE, G.; HAMDY, M.; RESTUCCIA, C. 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**, v.170, p.21-28, 2014.
- ANTUNES, M.D.C.; CAVACO, A. M. The use of essential oils for postharvest decay control. A review. **Flavour and Fragrance Journal**, v.25, p.351-366, 2010.
- 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 Medicináveis**. v.17, n.2, p.254-261, 2015.
- BASTOS, C.N. Efeito do óleo de *Piper aduncum* sobre *Crinipelis pernicioso* e outros fungos fitopatogênicos. **Fitopatologia Brasileira**, v.22, n.3, p.441-3, 1997.
- BEBBER, D.P.; GURR, S.J. Crop-destroying fungal and oomycete pathogens challenge food security. **Fungal Genetics and Biology**, v.74, p.62-64, 2015.
- 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. Antifungal activity and mechanism of citral, limonene and eugenol against *Zygosaccharomyces rouxii*. **LWT - Food Science and Technology**, v.106, p.50-56, 2019.

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

CHEE, Y.H.; KIM, H.; LEE, M.H. *In vitro* antifungal activity of limonene against *Trichophyton rubrum*. **Mycobiology**, v.37, n.3, p.243-246, 2009.

CHOI, H.; SONG, H.S.; UKEDA, H.; SAWAMURA, M. Radical-Scavenging activities of Citrus essential oil and their components: Detection using 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, p.4156-4161, 2000.

CHUTIA, M.; DEKA BHUYAN, P.; PATHAK, M.G.; SARMA, T.C.; BORUAH, P. Antifungal activity and chemical composition of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against phytopathogens from North East India. **LWT – Food Science and Technology**, v.42, n.3, p.777-780, 2009.

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. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, v.13, n.4, p.414-430, 2012.

FENG, W.; ZHENG, X. Essential oils to control *Alternaria alternata* *in vitro* and *in vivo*. **Food Control**, v.18, p.1126-1130, 2007.

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

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. Multivariate analysis of the essential oil components of the genus *Citrus* and their antifungal activity. **Científica**, v.41, n.2, p.111-121, 2013.

GUIMARÃES, L.G.L.; CARDOSO, M.G.; SOUSA, P.E.; ANDRADE, J.; VIEIRA, S.S. Antioxidant and fungitoxic activities of the lemongrass essential oil and citral. **Revista Ciência Agrônômica**, v.42, n.2, p.464-472, 2011.

HAMMER, O.; HARPER, D.A.T.; RYAN, P.D. Past: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Paleontologia Electronica**. v. 4, n.1, p.9, 2001.

HOYOS, J.M.A.; ALVES, E.; ROZWALKA, L.C.; SOUZA, A.S.; ZEVIANI, W.M. Antifungal activity and ultrastructural alterations in *Pseudocercospora griseola* treated with essential oils. **Ciência e Agrotecnologia**, v.36, n.3, p.270-284, 2012.

LIMA NB, LIMA WG, TOVAR-PEDRAZA JM, MICHEREFF SJ, CÂMARA, M.P.S. Comparative epidemiology of *Colletotrichum* species from in northeastern Brasil. **European Journal of Plant Pathology**, v.141, p.679-688, 2015.

LIMA, J. R.; GONÇALVES, L. R. B.; BRANDÃO, L. R.; ROSA, C. A.; VIANA, F. M. P. Isolation, identification and activity *in vitro* of killer yeasts against *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from tropical fruits. **Journal of Basic Microbiology**, v.52, p.1-10, 2012.

MAHATO, N.; SHARMA, K.; SINHA, M.; CHO, M. H. Citrus waste derived nutra-pharmaceuticals for health benefits: Current trends and future perspectives. **Journal of Functional Foods**, v.40, p.307-316, 2018.

MAREI, G.I.K.; RASOUL, M.A.A.; ABDELGALEIL. Comparative antifungal activities and biochemical effects of monoterpenes on plant pathogenic fungi. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.103, p.56-61, 2012.

METOU, N.; GARGOURI, S.; AMRI, I.; FEZZANI, T.; JAMOSSI, B.; HAMROUNI, L. Activity antifungal of the essential oils; aqueous and ethanol extracts from *Citrus aurantium* L. **Natural Product Research**, v.29, n.23, p. 2238-2241, 2015.

NJOROGE, S.M.; MUNGAI, H.N.; KOAZE, H.; PHI, N.T.L.; SWAMURA, M. Volatile constituents of mandarin *Citrus reticulata* Blanco peel oil from Burundi. **Journal of Essential Oil Research**, v.18, p.659-662, 2006.

OKWI, D. E.; EMENIKE, I. N. Evaluation of the phytonutrients and vitamins contents of *Citrus* fruits. **International Journal of Molecular Medicine and Advance Sciences**, v.2, n.1, p. 1-6, 2006.

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. Efeito fungitóxico do óleo essencial de aroeira da praia (*Schinus terebinthifolius* RADDI) sobre *Colletotrichum gloeosporioides*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.15, n.1, p.150-157, 2013.

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.). 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. Bioactive Compounds from Mexican Lime (*Citrus aurantifolia*) juice induce apoptosis in human pancreatic cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, p. 10933-10942, 2009.

PEGG, K. G.; COATES, L. M.; KORSTEN, L.; HARDING, R. M. Foliar, fruit and soilborne diseases. In: **The Avocado: Botany, Production and Uses**. Whiley A.W., Schaffer B. and Wolstenholme B. N. (eds): CAB International, Wallingford, UK, pp. 299-338, 2002.

PEREIRA F.D. Caracterização morfo-cultural 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. Inibição do desenvolvimento fúngico através da utilização de óleos essenciais de condimentos. **Ciência e Agrotecnologia**, v.30, n.4, p.731-738, 2006.

PICCININ, E.; PASCHOLATI, S.F.; DI PIERO, R.M.; BENATO, E.A. Doenças do abacateiro. 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: Ceres, v.2, p.1-7. 2016.

RODRIGUES, A.A.; BEZERRA NETO, E.; COELHO, R.S. Indução de resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. tracheiphilum em caupi: Eficiência de indutores abióticos e atividade enzimática elicitada. **Fitopatologia Brasileira**, v.31, n.5, p.492-499, 2006.

RUSSO, M.; SURACI, F.; POSTORINO, S.; SERRA, D.; ROCCOTELLI, A.; AGOSTEO, G.E. Essential oil chemical composition and antifungal effects on *Sclerotium cepivorum* of *Thymus capitatus* wild populations from Calabria, southern Italy. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.23, n.2, p.239-248, 2013.

SHARMA, K.; MAHATO, N.; CHO, M. H.; LEE, Y. R. Converting citrus wastes into value-added products: Economic and environmentally friendly approaches. **Nutrition**, v.34, p.29-46, 2017.

SISKOS, E. P.; MAZOMENOS, B. E.; KONSTANTOPOULOU, M. A. Isolation and identification of insecticidal components from *Citrus aurantium* fruit peel extract. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.56, n.14, p.5577-5581, 2008.

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

VITORATOS, A.; BILALIS, D.; KARKANIS, A.; EFTHIMIADOU, A. Antifungal activity of plant essential oils against *Botrytis cinerea*, *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum*. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici**, v.41, n.1, p.86-92, 2013.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

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.

## REFERÊNCIAS

- ABECITRUS. O Mercado Mundial de Laranja. São Paulo, 9 p., 2013. Disponível em <www.abecitrus.com.br>. Acesso em out. de 2019.
- AHMAD, M. M.; REHMAN, S.; IQBAL, Z.; ANJUM, F. M.; SULTAN, J. I. Genetic variability to essential oil composition in four citrus fruit species. *Pakistan Journal of Botany*, Karachi, v. 38, n. 2, p. 319-324, 2006.
- AIELLO, D.; CARRIERI, R.; GUARNACCIA, V.; VITALE, A.; LAHOZ, E.; POLIZZI, G. Characterization and Pathogenicity of *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. karstii* causing preharvest disease on *Citrus sinensis* in Italy. **Journal of Phytopathology**, v. 163, p. 168-177, 2015.
- AKILA, R., RAJENDRAN, L., HARISH, S., SAVEETHA, K., RAGUCHANDER, T., & SAMIYAPPAN, R. (2011). Combined application of botanical formulations and biocontrol agents for the management of *Fusarium oxysporum f. sp. cubense* (Foc) causing Fusarium wilt in banana. **Biological control**, v. 57, n. 3, p. 175-183, 2011.
- ALI, ASGAR; HEI, GOH KAR; KEAT, YEOH WEI. Efficacy of ginger oil and extract combined with gum Arabic on anthracnose and quality of papaya fruit during cold storage. **Journal of food science and technology**, v. 53, n. 3, p. 1435-1444, 2016.
- AMARO, A.A.; BAPTISTELLA, C.S.L. **Viveiro de citros: Uma visão econômica**. Instituto de Economia AgrícolaIEA, Texto para discussão, São Paulo, v.23, n.1-13, 2010.
- AMBROSIO, C. M. S.; ALENCAR, S. M.; SOUSA, R. L. M.; MORENO, A. M.; DA GLORIA, E. M. Antimicrobial activity of several essential oils on pathogenic and beneficial bacteria. **Industrial Crops and Products**, v.97, p.128-136, 2017.
- ARBOS, K. A.; STEVANI, P. C.; CASTANHA, R. F. Atividade antimicrobiana, antioxidante e teor de compostos fenólicos em casca e amêndoa de frutos de manga. **Revista Ceres**, v.60, n.2, p.1, 2013.



ASHWINI, N.; SRIVIDYA, S. Potentiality of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent for management of anthracnose disease of chilli caused by *Colletotrichum gloeosporioides* OGC1. **Biotechnology**, v. 4, p. 127-136, 2014.

AVILA-SOSA, R.; GASTÉLUM-REYNOSO, G.; GARCÍA-JUÁREZ, M.; MENESESSÁNCHEZZ, 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.

AZAMBUJA, W. **Óleo essencial de limão**. Disponível em: <<http://oleoessenciais.org/óleo-essencial-de-limao/>>. Acesso em: 12 nov. 2019.

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, pp. 254-261, 2015.

BASTOS, C.N.; ALBUQUERQUE, P.S.B. Efeito do óleo de *Piper aduncum* no controle em pós-colheita de *Colletotricum musae* em banana. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 5, p. 555-557, 2004.

BASTOS, D. C., FERREIRA, E. A., PASSOS, O. S., ATAÍDE, E., & CALGARO, M. **Cultivares copa e porta-enxertos para a citricultura brasileira**. Embrapa Semiárido- Artigo em periódico indexado (ALICE), 2014.

BAUTISTA-BAÑOS, S., SIVAKUMAR, D., BELLO-PÉREZ, A., VILLANUEVA-ARCE, R., & HERNÁNDEZ-LÓPEZ, M. A review of the management alternatives for controlling fungi on papaya fruit during the postharvest supply chain. **Crop Protection**, v. 49, p. 8-20, 2013.

BERALDO, C.; DANELUZZI, N. S.; SCANAVACCA, J.; DOYAMA, J. T.; FERNANDES JÚNIOR, A.; MORITZ, C. M. F. Eficiência de óleos essenciais de

canela e cravo-da-índia 30 como sanitizantes na indústria de alimentos. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.43, n.4, p.436-440, 2013.

BIASI, A.; DESCHAMPS, C. Plantas aromáticas: do cultivo à produção de óleo essencial. Curitiba: **Layer Studio**, 2009.

BONETT, L. P., DE SOUZA HURMANN, E. M., JÚNIOR, M. C. P., ROSA, T. B., & SOARES, J. L. Biocontrole in Vitro de *Colletotrichum musae* por Isolados de *Trichoderma* spp. **UNICIÊNCIAS**, v. 17, n. 1, 2015.

BORSATO, A. V. et al. Yield and chemical composition of essential oil of the chamomile *Chamomilla recutita* (L.) Raeuchert extracted for steam distillation. **Semina: Ciências agrárias**, v. 29, n. 1, p. 129-136, 2008.

BOSQUEZ-MOLINA, E.; RONQUILLO-DE JESÚS, E.; BAUTISTA-BANOS, S.; VERDE-CALVO, J.R.; MORALES-LOPEZ, J. Inhibitory effect of essential oils against *Colletotrichum gloeosporioides* and *Rhizopus stolonifer* in stored *papaya* fruit and their possible application in coatings. **Postharvest Biología e Tecnonologia** n. 57, p. 132-137, 2010.

BOUSBIA, N.; VIAN, M. A.; FERHAT, M. A.; MEKLATI, B.Y.; CHEMAT, F. A. A new process for extraction of essential oil from *Citrus* peels: microwave hydrodiffusion and gravity. **Journal of Food Engineering**. v.90. 2009. p. 409-413.

BRAGANÇA, C. A.; DAMM, U.; BARONCELLI, R.; JÚNIOR, N. S. M.; CROUS P. W. Species of the *Colletotrichum acutatum* complex associated with anthracnose diseases of fruit. **Brazil. Fungal Biology**, v. 120, p. 547–561, 2016.

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. 104p. **Dissertação** (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa. Resolução – **RDC, n. 2, de 15 de janeiro de 2007**. Disponível em:<<http://www.anvisa.gov.br>>.

CALO, J. R., CRANDALL, P. G., O'BRYAN, C. A., & RICKE, S. C. Essential oils as antimicrobials in food systems—A review. **Food Control**, v. 54, p. 111-119, 2015.

CANDIDO SILVA, E.K.; MELO, L.G.L. Manejo de doenças de plantas: Um enfoque agroecológico. **Revista EDUCamazônia—Educação Sociedade e Meio Ambiente**. v. 10, n. 1, p. 143-157, 2013.

CARNELOSSI, P. R., SCHWAN-ESTRADA, K. R. F., CRUZ, M. E. S., ITAKO, A. T., & MESQUINI, R. M. Óleos essenciais no controle pós-colheita de *Colletotrichum gloeosporioides* em mamão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 4, p. 399-406, 2009.

CARVALHO, J. L. S.; BLANK, A. F.; ALVES, P. B.; EHLERT, P. A. D.; MELO, A. S.; CAVALCANTI, S. C. H.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; SILVAMANN, R. S. Influence of the harvesting time, temperature and drying period on basil (*Ocimum basilicum L.*) essential oil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 1, p. 24-30, 2006.

CASTELLANI, A. Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. Further Researches. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.70, p.181-184, 1967.

CHE, J., LIU, B., RUAN, C., TANG, J., & HUANG, D. Biocontrol of *Lasiodiplodia theobromae*, which causes black spot disease of harvested wax apple fruit, using a strain of *Brevibacillus brevis* FJAT-0809-GLX. **Crop Protection**, v. 67, p. 178-183, 2015.

CHITARRA, M.I.F.; CHITARRA, A.B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças**. Editora UFLA, Lavras, p. 783, 2005.

CHOI, H.; SONG, H. S.; UKEDA, H.; SAWAMURA, M. Radical-Scavenging activities of Citrus essential oil and their components: Detection using 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48: p. 4156-4161, 2000.

CHON, R.; CHON, A. L. Subprodutos del procesado de las frutas. In: ARTHEY, D; ASHURST, P. R. (Eds.). *Procesado de Frutas*. Zaragoza: Acribia, 1997. 273 p.

CHUTIA, M.; DEKA BHUYAN, P.; PATHAK, M.G.; SARMA, T.C.; BORUAH, P. Antifungal activity and chemical composition of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against phytopathogens from North East India. **LWT – Food Science and Technology**, v.42, n.3, p.777-780, 2009.

COELHO, A. M.; PAULA, J. E.; ESPÍNDOLA, L. Atividade larvicida de extratos vegetais sobre *Aedes aegypti* (L.)(*Diptera: Culicidae*), em condições de laboratório. **Biossay**, v. 4, 2000.

COIMBRA, J. L., SOARES, A. C. F., GARRIDO, M. D. S., SOUSA, C. D. S., & RIBEIRO, F. L. B. Toxicity of plant extracts to *Scutellonema bradys*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 7, p. 1209-1211, 2006.

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.

CUNHA, A. P., CAVALEIRO, P., SALGUEIRO, L. (2010). **Capítulo 16 – Fármacos aromáticos – plantas aromáticas e óleos essenciais**. *Farmacognosia e Fitoquímica*. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian. pp. 339 – 482.

DAFERERA, D. J.; ZIOGAS, B. N.; POLISSIOU, M. G. Analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. **Journal Agriculture Food Chemical**n. 48, p. 2576-2581, 2013.

DAMM, U.; CANNON, P. F.; WOUDEBERG, J. H. C.; CROUS, P. W. The *Colletotrichum acutatum* species complex. **Studies in Mycology**, v.73, p.37– 113, 2012.

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. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, v. 13, n. 4, p. 414 – 430, 2012.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Production. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/DesktopDefault.aspx?PageID=567#anco>>. Acesso em outubro de 2019.

FAO. The State of Food Insecurity in the World. Roma, Itália. p. 1-180, 2009a. Disponível em:<<http://apps.fao.org>>. Acesso em outubro de 2019.

FAROOQ, M.; JABRAN, Z.A; CHEEMA, A.; WAHID, K.H.M. The role of allelopathy in agricultural pest management. **Pest Management Science**, v. 67, p. 493-506, 2011.

FARR, D. F.; ROSSMAN, A. Y. **Fungal databases, systematic mycology and microbiology laboratory**, ARS, USDA, 2017. Acesso em 26 de setembro de 2019. <https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>

FERHAT, M.A.; MEKLATI, B.Y.; CHEMAT, T.F. Comparison of different isolation methods of essential oils from Citrus fruits: cold pressing, hydrodistillation and microwave "dry" distillation. **Flavour and fragrance Journal**, v. 22, p.494-504, 2007

FILHO, R. M. L., OLIVEIRA, S. M., & MENEZES, M. Caracterização enzimática e patogenicidade cruzada de *Colletotrichum* spp. associados a doenças de pós-colheita. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 620-625. 2003.

FISHER, KATIE; PHILLIPS, CAROL. Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer?. **Trends in food science & technology**, v. 19, n. 3, p. 156-164, 2008.

FREIRE, M. M., JHAM, G. N., DHINGRA, O. D., JARDIM, C. M., BARCELOS, R. C., & VALENTE, V. M. M Composition, antifungal activity and main fungitoxic components of the essential oil of *Mentha piperita* L. **Journal of Food Safety**, v. 32, n. 1, p. 29-36, 2012.

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

GAO, Z.; GAO, W.; ZENG, S.; LI, L.; LIU, E. Chemical structures, bioactivities and molecular mechanisms of *citrus* polymethoxyflavones. **Journal of Functional Foods**, v.40, p.498-509, 2018.

GERSHENZON, J.; DUDAREVA, N. – The function of terpene natural products in the natural world. **Nature Chemical Biology**, v.3,n.7, p.408-414, 2007.

GHELARDINI, C.; GALEOTTI, N.; SALVATORE, G.; MAZZANTI, G. Local anesthetic activity of the essential oil of *Lavandula angustifolia*. **Planta Med**, v. 65, p. 700-703, 1999.

GOMES, H. F. Influência de porta-enxertos sobre a tolerância e susceptibilidade a doenças em citros. – Anápolis: Centro Universitário de Anápolis – UniEvangélica, 2018.

GUIMARÃES, L.G.L.; CARDOSO, M.G.; SOUSA, P.E.; ANDRADE, J.; VIEIRA, S.S. Antioxidant and fungitoxic activities of the lemongrass essential oil and citral. **Revista Ciência Agronômica**, v.42, n.2, p.464-472, 2011.

GUTIERREZ, J.; BARRY-RYAN, C.; BOURKE, P. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. **International Journal of Food Microbiology**, v.124, n.1, p.91-97, 2008.

HAMMER, Ø.; HARPER, D.A.; RYAN, P.D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia electronica**, v.4, n.1, p.9, 2001.

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

HUNUPOLAGAMA, D. M.; WIJESUNDERA, R. L. C.; CHANDRASEKHARAN, N. V.; WIJESUNDERA, W. S. S.; KATHRIARACHCHI, H. S.; FERNANDO, T. H. P. S. Characterization of *Colletotrichum* isolates causing avocado anthracnose and first report of *C. gigasporum* infecting avocado in Sri Lanka. **Plant Pathology & Quarantine**, v. 5, n. 2, p. 132–143, 2015.

IBRAHIM, M. A.; KAINULAINEN, P.; AFLATUNI, A.; IKKALA, K. T.; HOLOPAINEN, J. K. Insecticidal, repellent, antimicrobial activity and phytotoxicity of essential oils: with special reference to limonene and its suitability for control of insect pests. **Agricultural and Food Science**, v. 10: p. 243-259, 2001.

INFANTE, J.; SELANI, M. M.; TOLEDO, M. N. V.; SILVEIRA-DINIZ, M. F.; ALENCAR, S. M.; SPOTO, M. H. F. Atividade antioxidante de resíduos agroindustriais de frutas tropicais. **Alimentos e Nutrição**, v.24, n.1, p.87-91, 2013.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção agrícola municipal**. Rio de Janeiro, 2016. Disponível em:

<<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam>>

JARDIM, C.M. et al. Chemical composition and antifungal activity of the hexane extract of the brazilian *Chenopodium Ambrosioides* L. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 10, p. 1814-1818, 2010.

JOHNSON, O. O., AYOOLA, G. A., ADENIPEKUN, T. (2013). Antimicrobial Activity and the Chemical Composition of the Volatile Oil Blend from *Allium sativum* (Garlic Clove) and *Citrus reticulata* (Tangerine Fruit). **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research**, volume 5. pp. 187 – 193.

JUNEJA, V. K.; DWIVEDI, H. P; YAN, X. Novel natural food antimicrobials. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 3, n. 1, p. 381-403, 2012.

KAESUKSAENG, S., URANO, Y., AIAMLA-OR, S., SHIGYO, M., & YAMAUCHI, N. Effect of UV-B irradiation on chlorophyll-degrading enzyme activities and postharvest quality in stored lime (*Citrus latifolia* Tan.) fruit. **Postharvest biology and technology**, v. 61, n. 2-3, p. 124-130, 2011.

KERROLA, K.; GALAMBOSI, B.; KALLIO, H. Volatile components and odor intensity of four phenotypes of hyssop (*Hyssopus officinales* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, n. 3, p. 776-781, 1994.

KISHORE, G. K., PANDE, S., & HARISH, S. Evaluation of essential oils and their components for broad-spectrum antifungal activity and control of late leaf spot and crown rot diseases in peanut. **Plant Disease**, v. 91, n. 4, p. 375-379, 2007.

KUMAR R.; DUBEY, N. K.; TIWARI, O. P.; TRIPATHI, Y.B.; SINHA, K.K. Evaluation of some essential oils as botanical fungitoxicants for the protection of stored food commodities from infestation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, n. 87, p. 1737–1742, 2008.



LIMA NB, LIMA WG, TOVAR-PEDRAZA JM, MICHEREFF SJ, Câmara MPS (2015) Comparative epidemiology of *Colletotrichum* species from in northeastern Brasil. **European Journal of Plant Pathology** 141:679-688.

LOPES, J. M. S., DÉO, T. F. G., ANDRADE, B. M., GIROTO, M., FELIPE, A. L. S., JUNIOR, C. E. I., LIMA, F. C. C. Importância econômica dos citros no Brasil. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, v. 20, n. 1, 2011.

LOPEZ, A. M. Q.; LUCAS, J. A. Colletotrichum Isolates Related to Anthracnose of Cashew Trees in Brazil: Morphological and Molecular Description Using LSU rDNA Sequences. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, p. 741-752, 2010.

LORENZI, H., BACHER, L., LACERDA, M., & SARTORI, S. **Frutas brasileiras e exóticas cultivadas (de consumo in natura)**. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2006, 640p.

LOTA, M.L; SERRA,D.DE R.;TOMI,F.; JACQUEMOND,C.;CASANOVA,J. Volatile components of peel and leaf oils os lemon and lime species. **Journal Agriculture Food Chemistry**. v.50, p.796-805, 2002.

LUPE, F. A. **Estudo da composição química de óleos essenciais de plantas aromáticas da Amazônia**. 2007. p. 120. Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, Campinas, 2007.

MA, Y.; YE, X.; HAO, Y.; XU, G.; LIU, D. Ultrasound-assisted extraction of hesperidin from Penggan (*Citrus reticulata*) peel. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.15, n.3, p.227-232, 2008.

MAHARAJ, A.; RAMPERSAD, S. N. Genetic differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. truncatum* associated with Anthracnose disease of papaya (*Carica papaya L.*) and bell pepper (*Capsium annuum L.*) based on ITS PCR-RFLP fingerprinting. **Molecular Biotechnology**, v. 50, n. 3, p. 237-249, 2012.

MAHATO, N.; SHARMA, K.; SINHA, M.; CHO, M. H. Citrus waste derived nutra-/pharmaceuticals for health benefits: Current trends and future perspectives. **Journal of Functional Foods**, v.40, p.307-316, 2018.

MARINELLI, E., ORZALI, L., LOTTI, E., & RICCIONI, L. Activity of some essential oils against pathogenic seed borne fungi on legumes. **Asian Journal of Plant Pathology**, v. 6, n. 3, p. 66-74, 2012.

MENDONÇA, L.M.V.L.; CONCEIÇÃO, A.; PIEDADE, J.; CARVALHO, V.D.; THEODORO, V.C.A. Caracterização da composição química e do rendimento dos resíduos industriais do limão Tahiti (*Citrus latifolia* Tanaka). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.26, n.4, 870-874, 2006.

MIRANDA, C. A. S. F., DAS GRAÇAS CARDOSO, M., BATISTA, L. R., RODRIGUES, L. M. A., & DA SILVA FIGUEIREDO, A. C. Óleos essenciais de folhas de diversas espécies: propriedades antioxidantes e antibacterianas no crescimento espécies patogênicas. **Revista Ciência Agronômica**, v. 47, n. 1, p. 213-220, 2016.

MOHAMMAD, Y. M., RAEI, P., ALIZADEH, N., AGHDAM, M. A., & KAFIL, H. S. Carvacrol and thymol: strong antimicrobial agents against resistant isolates. **Reviews in Medical Microbiology**, v. 28, n. 2, p. 63-68, 2017.

MULLER, PISCILA SCHULTZ. Microencapsulação do óleo essencial de laranja. 2011.

NEVES, M. F.; TROMBIN, V.G. **Anuário da citricultura 2017**. 1.ed. São Paulo: Citrusbr, 2017.

NJOROGE, S. M. et al. Essential oil constituents of three varieties of Kenyan sweet oranges (*Citrus sinensis*). **Flavour and Fragrance Journal**, v. 20, p. 80-85, 2005.

OECD/FAO (2016), **OECD-FAO Agricultural Outlook 2016-2025**, OECD Publishing, Paris. doi: [http://dx.doi.org/10.1787/agr\\_outlook-2016-en](http://dx.doi.org/10.1787/agr_outlook-2016-en).

OKWI, D. E.; EMENIKE, I. N. Evaluation of the phytonutrients and vitamins contents of Citrus fruits. **International Journal of Molecular Medicine and Advance Sciences**, v.2, n.1, p. 1-6, 2006.

OLIVEIRA, R. A. G, LIMA, E. O.; VIEIRA W. L.; FREIRE, K. R. L.; TRAJANO, V. N.; LIMA, I. O.; SOUZA, E. L. TOLEDO, M. S.; SILVA-FILHO, R. N. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica, **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 16, n.1, p. 77-82, 2006.

PADUCH, R.; KANDEFER-SZERSZEŃ, M.; TRYTEK, M.; FIEDUREK, J. Terpenes: Substances useful in human healthcare. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v.55, n.5, p.315-327, 2007.

PANESAR, P. S.; KAUR, R.; SINGLA, G.; SANGWAN, R. S. Bio-processing of agroindustrial wastes for production of food-grade enzymes: progress and prospects. **Applied Food Biotechnology**, v.3, n.4, p.208-227, 2016.

PARDO-DE LA HOZ, C. J.; CALDERON, C.; RINCON, A. M.; CÁRDENAS, M.; DANIESA, G.; LÓPEZ-KLEINEB, L.; RESTREPOA, S.; JIMÉNEZ, P. Species from the *Colletotrichum acutatum*, *Colletotrichum boninense* and *Colletotrichum gloeosporioides* species complexes associated with tree tomato and mango crops. **Colombia. Plant Pathology**, v. 65, p. 227-237, 2016

PASIANI, J.O. Knowledge, attitudes, practices and biomonitoring of farmers and residents exposed to pesticides in Brazil. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 9, p. 3051-3068, 2012.

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

PEGG, K. G.; COATES, L. M.; KORSTEN, L.; HARDING, R. M. 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, pp. 299-338, 2002.

PELIZER, L. H.; PONTIERI, M. H.; MORAES, I. O. Utilização de resíduos agroindustriais em processos biotecnológicos como perspectiva de redução do impacto ambiental. **Journal of Technology Management & Innovation**, v. 2, n.1, p.118-27, 2007.

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

PERRUCHON, C., CHATZINOTAS, A., OMIROU, M., VASILEIADIS, S., MENKISSOGLU-SPIROUDI, U., & KARPOUZAS, D. G. Isolation of a bacterial consortium able to degrade the fungicide thiabendazole: the key role of a *Sphingomonas* phylotype. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 101, n. 9, p. 3881-3893, 2017.

PHILLIPS, A. J. L., ALVES, A., ABDOLLAHZADEH, J., SLIPPERS, B., WINGFIELD, M. J., GROENEWALD, J. Z., & CROUS, P. W. The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. **Studies in mycology**, v. 76, p. 51-167, 2013.

RAKESH, K.P.; SINGH, R., Anthracnose of mango incited by *Colletotrichum gloeosporioides*: A comprehensive review. **International Journal of Pure & Applied Bioscience**, v. 5, n. 1, p. 48-56, 2017.

RANTZSCH, U.; VACCA, G.; DUK, R.; GILLISSEN, A. Anti-inflammatory effects of myrtol standardized and other essential oils on alveolar macrophages from patients with chronic obstructive pulmonary disease. **European Journal of Medical Research**, v.14, n.4, p.205-209, 2009.

- RAUT, JAYANT S.; KARUPPAYIL, Sakunny M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial crops and products**, v. 62, p. 260-264, 2014.
- REIS, A.; BOITEUX, L.; HENZ, G. P. Antracnose em Hortaliças da Família Solanacea. Brasília: **Embrapa Hortaliças**, 2009. 9p. (Embrapa Hortaliças. Circular Técnica 79).
- RESTUCCIA, C., CONTI, G. O., ZUCCARELLO, P., PARAFATI, L., CRISTALDI, A., & FERRANTE, M. Efficacy of different citrus essential oils to inhibit the growth and B1 aflatoxin biosynthesis of *Aspergillus flavus*. **Environmental Science and Pollution Research**, v.26, n.30, p.31263-31272, 2019.
- REZZADORI, K.; BENEDETTI, S.; AMANTE, E. R. Proposals for residues recovery: orange waste as raw material for new products. **Food and Bioproducts Processing**, v.90, n.4, p.606-614, 2012.
- RIBAS, P.R.; MATSUMURA, A.T.S. A química dos agrotóxicos: Impacto sobre a saúde e meio ambiente. **Revista Liberato**, v. 10, n. 14, p. 149-158. 2009.
- RIGOTTO, R.M.; VASCONCELOS, D.P.; ROCHA, M.M. Uso de agrotóxicos no Brasil e problemas para a saúde pública. **Caderno de Saúde Pública**, v. 30, n. 7, p. 1-3, 2014.
- ROCHA, M. S. R. S.; ALMEIDA, R. M. R. G.; CRUZ, A. J. G. Avaliação do potencial energético de resíduos agroindustriais provenientes de diferentes regiões brasileiros. **Engevista**, v.19, n.1, p. 217-235, 2017.
- RODRIGUES, A. A., BEZERRA NETO, E., & COELHO, R. S. Indução de resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* em caupi: eficiência de indutores abióticos e atividade enzimática elicitada. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 5, p. 492-499, 2006.
- ROMANAZZI, G., NIGRO, F., IPPOLITO, A., & SALERNO, M. Effect of short hypobaric treatments on postharvest rots of sweet cherries, strawberries and table grapes. **Postharvest Biology and Technology**, v. 22, n. 1, p. 1-6, 2001.

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

SAHRAOUI, N.; VIAN, M. A.; EL MAATAOUI, M.; BOUTEKEDJIRET, C.; CHEMAT, F. Valorization of citrus by-products using Microwave Steam Distillation (MSD). **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.12, n.2, p. 163-170, 2011.

SANTANA, H. C. D. de. Caracterização química do óleo essencial de *Baccharis reticularia* DC. (Asteraceae) em função de diferentes procedências e da sazonalidade no Distrito Federal. Brasília. 2013. 73 fls. **Dissertação** (Mestrado em Agronomia) Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília.

SANTANA, V.S.; MOURA, M.C.P.M.; NOGUEIRA, F.F. Mortalidade por intoxicação ocupacional relacionada a agrotóxicos, 2000-2009, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 47, n. 3, p. 598-606, 2013.

SANTOS, A. C. A; SERAFINI, L. A; CASSEL, E. **Estudos de processos de extração de óleos essenciais e bioflavonóides de frutas cítricas**. Caxias do Sul, 2003. 112p.

SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R. Extratos e óleos essenciais de plantas medicinais na indução de resistência. In: CAVALCANTI, L.S. et al. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: Fealq, 2005. p.125-32.

SENEVIRATHNE, M.; JEON, Y. J.; HA, J. H.; KIM, S. H. Effective drying of citrusby-product by high speed drying: a novel drying technique and theirantioxidant activity. **Journal of Food Engineering**, v.92, p.157-163,2009.

SHARMA, K.; MAHATO, N.; CHO, M. H.; LEE, Y. R. Converting citrus wastes into value-added products: Economic and environmentally friendly approaches. **Nutrition**, v.34, p.29-46, 2017.

SHARMA, M.; KULSRHETHA, S. *Colletotrichum gloeosporioides*: An anthracnose causing pathogen of fruits and vegetables. **Biosciences Biotechnology Research**, v. 12, n. 2, p. 1233-1246, 2015.

SIANI, Antônio C.; SAMPAIO, André L. F.; SOUSA, Mariana C.; HERNRIQUES, Maria G. M. O.; RAMOS, Monica F. S. Óleos essenciais: Potencial anti-inflamatório. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, p. 38-43, 2000.

SILVA, A. C. D., SOUZA, P. E. D., AMARAL, D. C., ZEVIANI, W. M., & PINTO, J. E. B. P. Essential oils from *Hyptis marrubioides*, *Aloysia gratissima* and *Cordia verbenacea* reduce the progress of Asian soybean rust. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 36, n. 2, p. 159-166, 2014.

SILVA, A. D., SALES, N. D. L. P., ARAÚJO, A. D., & CALDEIRA-JÚNIOR, C. F. Efeito in vitro de compostos de plantas sobre o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. isolado do maracujazeiro. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, n. spe, p. 1853-1860, 2009.

SILVA, E. O.; ALVES, E.; FERREIRA, T. C.; ALBUQUERQUE, C. A. C. Óleos essenciais no controle da pinta bacteriana e na ativação de respostas bioquímicas em tomateiro. **Summa Phytopathologica**, v.43, n.3, p.212-217, 2017.

SILVA, R. S. MAGNO, C.R.; RIBEIRO, M. N.; BLOIS, G. S. O. Óleo essencial de limão no ensino da cromatografia em camada delgada. **Química Nova**, v. 32, N. 8, p. 2234-2237, 2009.

SILVEIRA, J. C.; BUSATO, N. V.; COSTA, A. O. S.; COSTA JR., E. F. Levantamento e análise de métodos de extração de óleos essenciais. **Enciclopédia Biosfera**, v.8, n.15, p.2038-2052, 2012.

SIMÕES, C.M.O, SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G., MELLO. J.C.P, MENIS, L.A, PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5 ed. Editora da UFSC, 2003.

SIMÕES, Cláudia Maria O. **Farmacognosia: Da planta ao medicamento**. 3. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS / Editora da UFSC, 2010.

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

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

SPARKMAN, O. D.; PENTON, Z.; KITSON, F. G. Gas chromatography and mass spectrometry: a practical guide. **Academic Press**, 2011.

STEVIC, T.; BERIC, T.; SAVIKIN, K.; SOKOVIC, M.; GODEVAC, D.; DIMKIC, I.; STANKOVIC, S.; Antifungal activity of selected essential oils against fungi isolated from medicinal plants. *Ind. Crops Production*, n. 55, p. 116–122, 2014.

STORCK, C. R.; NUNES, L. G.; OLIVEIRA, B. B.; BASSO, C. Folhas, talos, cascas e sementes de vegetais: composição nutricional, aproveitamento na alimentação e análise sensorial de preparações. **Ciência Rural**, v.43, n.3, p.537-543, 2013.

THANGAVELU, R.; GOPI, M. Field suppression of Fusarium wilt disease in banana by the combined application of native endophytic and rhizospheric bacterial isolates



possessing multiple functions. **Phytopathologia Mediterranea**. v. 54, p. 241-252, 2015.

the answer? **Trends in Food Science & Technology**, v.19, p.156-164, 2008.

TIENNE L.; DESCHAMPS, M. C.; ANDRADE, A.M. Produção de carvão e subprodutos da pirólise da casca e do bagaço de laranja (*Citrus sinensis*). **Biomassa & Energia**, v.1, n2, p.191-7, 2004.

UDAYANGA, D.; MANAMGODA, D. S.; LIU, X.; CHUKEATIROTE, E.; HYDE, K. D. What are the common anthracnose pathogens of tropical fruits? **Fungal Diversity**, v. 61, n. 1, p.165 - 179, 2013.

VEKIARI, S. A., PROTOPAPADAKIS, E. E., PAPADOPOULOU, P., PAPANICOLAOU, D., PANOU, C., & VAMVAKIAS, M. Composition and seasonal variation of the essential oil from leaves and peel of a Cretan lemon variety. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 1, p. 147-153, 2002.

VIANA, D. S. Lima ácida (*Citrus latifolia*, *Tanaka*), cv. Tahiti, de cultivos convencional e orgânico biodinâmico: Avaliação da capacidade antioxidante dos sucos in natura e clarificados por membranas de microfiltração. 2010. **Tese** (Doutorado em Ciências Farmacêuticas).Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2010.

WIDMER, W.; ZHOU, W.; GROHMANN. K. Pretreatment effects on orange processing waste for making ethanol by simultaneous saccharification and fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, p.5242-49, 2010.

WOLFFENBUTTEL. A. N. **Base da química dos óleos essenciais e aromoterapia: abordagem técnica e científica**. São Paulo: Roca, 2010.

YAN, F. *et al.* Effect of rhamnolipids on *Rhodotorula glutinis* biocontrol of *Alternaria alternata* infection in cherry tomato fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 97, p. 32-35, 2014.

YAN, F., XU, S., CHEN, Y., & ZHENG, X. Effect of rhamnolipids on *Rhodotorula glutinis* biocontrol of *Alternaria alternata* infection in cherry tomato fruit. **Postharvest biology and technology**, v. 97, p. 32-35, 2014.

YAN, J.; JAYAWARDENA, M. M. R. S.; GOONASEKARA, I. D.; WANG, Y.; ZHANG, W.; LIU, M.; HUANG, J.; WANG, Z.; SHANG, J.; PENG, Y.; BAHKALI, A.; HYDE, K. D.; LI, X. Diverse species of *Colletotrichum* associated with grapevine anthracnose in China. **Fungal Diversity**, v. 71, p. 233–246, 2015.

ŽIVKOVIĆ, S., STOJANOVIĆ, S., IVANOVIĆ, Ž., GAVRILOVIĆ, V., POPOVIĆ, T., & BALAŽ, J. Screening of antagonistic activity of microorganisms against *Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum gloeosporioides*. **Archives of Biological Sciences**, v. 62, n. 3, p. 611-623, 2010.

ZULIAN, A.; DÖRR, A. C.; ALMEIDA, S. C. Citricultura e agronegócio cooperativo no Brasil. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v.11, n.11, p.2290-2306, 2013.