

**JOSEANE BISO DE CARVALHO**

**POTENCIAL FUNGITÓXICO DE *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. E  
*Cymbopogon martinii* (Roxb.) J. F. Watson A *Colletotrichum* sp. E PROTEÇÃO  
PÓS-COLHEITA DE FRUTOS DE PIMENTÃO**

**MARINGÁ  
PARANÁ – BRASIL  
FEVEREIRO - 2006**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**JOSEANE BISO DE CARVALHO**

**POTENCIAL FUNGITÓXICO DE *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. E  
*Cymbopogon martinii* (Roxb.) J. F. Watson A *Colletotrichum* sp. E PROTEÇÃO  
PÓS-COLHEITA DE FRUTOS DE PIMENTÃO**

Dissertação apresentada à  
Universidade Estadual de Maringá como  
parte das exigências do Curso de Pós-  
Graduação em Agronomia, área de  
concentração Proteção de Plantas, para  
obtenção do título de Mestre.

**MARINGÁ  
PARANÁ – BRASIL  
FEVEREIRO - 2006**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

C331p Carvalho, Joseane Biso de  
Potencial fungitóxico de *Cymbopogon*  
*citratu*s(DC)Staf. e *Cymbopogon*  
*martinii*(Roxb.)J.F.Watson a *Colletotrichum* sp. e  
proteção pós-colheita de frutos de pimentão /  
Joseane Biso de Carvalho. - Maringá, PR : [s.n.],  
2006.  
60 f. : il. color.

Orientadora: Prof. Dr. Kátia Regina F. Schwan -  
Estrada.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de  
Maringá. Curso de Pós-graduação em Agronomia, 2006.

1. Pimentão - Pós-colheita - Controle  
alternativo. 2. Pimentão - Pós-colheita - Doenças.  
3. Pimentão - Pós-colheita - *Cymbopogon citratus* e  
*C. martinii* - Extrato de óleo essencial. 4. Pimentão  
- Pós-colheita - Indução de resistência.I.  
Universidade Estadual de Maringá. Curso de Pós-  
graduação em Agronomia. II. Título.

CDD 21.ed.635.643

À minha mãe e minha irmã, pela presença marcante em mais essa vitória e ao meu pai, cuja lembrança já se faz saudade, mas que em todos os momentos sejam eles tristes ou felizes sempre estiveram presentes em minha vida,

## **DEDICO**

*Se não houver frutos*

*Valeu pela beleza das flores*

*Se não houver flores*

*Valeu pela sombra das folhas*

*Se não houver folhas*

*Valeu pela intensão da semente*

Henfil

## **BIOGRAFIA**

JOSEANE BISO DE CARVALHO, filha de Manoel Liberalino de Carvalho (*in memoriam*) e Anecy Biso de Carvalho, nasceu em 12 de dezembro de 1979.

Em Março de 1998, iniciou o curso de Agronomia na Universidade Estadual de Maringá, onde se formou em maio de 2003.

Em março de 2004, ingressou no curso de mestrado em Agronomia, na área de concentração Proteção de Plantas, na Universidade Estadual de Maringá.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus por ter me concedido essa grande oportunidade e me proporcionado mais essa vitória.

À Professora Dra. Kátia Regina F. Schwan-Estrada, pela orientação, amizade, e compreensão em todos os momentos.

À Solange M. Bonaldo pela amizade, conselhos e orientações.

Aos amigos e colegas, do laboratório de Fitopatologia, Mauro, Júnior, Sônia, Clara, Akemi, Leonardo, Francielli, Gabriella, Ronilda e Rudimar. Aos amigos especialmente conquistados no dia-a-dia de trabalho, Marina, Francislene, Marilda, Gilmara, Adriana, Edgar, Patrícia, Ricardo e Bárbara, por fazerem parte dessa caminhada que infelizmente chegou ao fim.

À grande amiga Vanessa Stegani, que mesmo distante sempre se mostrou presente, desde os tempos da graduação.

Às amigas Daniele Felipe, Cristiane Moriwaki, Denise Pelegrini, Denise Akemi , Ana Paula pelas alegrias e horas de descontração que passamos juntas.

Aos professores Eliezer Rodrigues de Souto, João Batista Vida, Maria Eugênia da Silva Cruz e Bruno Luiz Domingos De Angelis, pelos ensinamentos, conselhos, orientações e contribuição ao desenvolvimento deste trabalho.

À CAPES, que possibilitou que a minha dedicação fosse total e exclusiva ao desenvolvimento desse trabalho.

Agradeço as demais pessoas igualmente importantes nesse meu caminho. Elas são muitas, mas todas colaboraram de alguma forma, seja por amizade, conselhos ou conhecimentos em algum momento.

## ÍNDICE

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	iii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Patossistema Pimentão ( <i>Capsicum annumm</i> L.) x <i>Colletotricum</i> sp. ....	3
2.1.1. A cultura do Pimentão ( <i>C. annumm</i> L.).....	3
2.1.2. Antracnose do Pimentão.....	5
2.2. Controle de doenças em plantas.....	6
2.2.1. Controle alternativo de doenças pós-colheita.....	7
2.2.2. Indução de resistência a fitopatógenos.....	9
2.2.2.1. Peroxidase.....	14
2.3. Potencial de plantas medicinais no controle de doenças pós-colheita.....	15
2.4. Plantas medicinais do Gênero <i>Cymbopogon</i> .....	19
2.4.1. <i>Cymbopogon citratus</i> (D.C.) Stapf. ....	19
2.4.2. <i>Cymbopogon martinii</i> (Roxb.) J. F. Watson.....	22
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1. Obtenção do isolado de <i>Colletotrichum</i> sp.....	24
3.2. Obtenção do extrato e óleo essencial de <i>C. citratus</i> e <i>C. martinii</i> .....	24
3.3. Inibição do crescimento micelial e da esporulação de <i>Colletotrichum</i> sp. ....	25
3.4. Inibição da germinação de esporos e formação de apressórios de <i>Colletotrichum</i> sp. ....	26
3.5. Proteção de frutos de pimentão em pós-colheita.....	27



3.5.1. Atividade da enzima peroxidase.....	29
3.5.1.1. Dosagem de proteínas e carboidratos totais das amostras.....	30
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
4.1. Crescimento micelial, esporulação, germinação de esporos e formação de apressórios.....	31
4.1.1. Extrato bruto aquoso.....	31
4.1.2. Óleo essencial.....	37
4.2. Proteção de frutos de pimentão em pós-colheita.....	38
4.2.1. Peroxidase.....	42
5. CONCLUSÕES.....	46
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
APÊNDICES.....	



## RESUMO

CARVALHO, Joseane Biso de, M. S., Universidade Estadual de Maringá, fevereiro de 2006. **Potencial fungitóxico de *Cymbopogon citratus* e *Cymbopogon martinii* a *Colletotrichum* sp. e proteção pós – colheita de frutos de pimentão.** Professora Orientadora: Kátia Regina Freitas Schwan-Estrada. Professor Conselheiro: João Batista Vida.

A antracnose do pimentão tem provocado elevadas perdas para a cultura na fase de pós-colheita, onde a doença é mais severa. O uso de métodos alternativos de controle nessa fase tem sido intensificado, uma vez que se busca a redução do uso de agrotóxicos, e o uso de plantas medicinais pode ser uma alternativa no controle de doenças. Com o objetivo de verificar o potencial fungitóxico das espécies *Cymbopogon citratus* e *C. martinii* “in vitro” e no controle alternativo de *Colletotrichum* sp em pimentão na pós-colheita. No ensaio “in vitro,” utilizou-se extrato bruto aquoso (EBA) autoclavado das duas espécies nas concentrações de 1, 5 , 10, 15, 20, 25 e 50% incorporado ao meio BDA e alíquotas de 1, 20, 40 e 60  $\mu\text{L}$  do óleo essencial (OE) distribuídas na superfície do meio BDA, para avaliar o crescimento micelial. Foi avaliado também a esporulação através da contagem de esporos em hemacitômetro, e a germinação de esporos e formação de apressório em placas de ELISA. No ensaio “in vivo”, frutos de pimentão foram inoculados com suspensão de esporos ( $1 \times 10^5$  esporos. $\text{mL}^{-1}$ ) e depois tratados com os EBA a 10 e 20% preparados por irradiação de microondas, e com extrato cítrico (controle positivo), 2 dias após a inoculação. Foram avaliados os parâmetros redução de peso, severidade da doença e atividades geral e específica de peroxidases. Os EBA das duas espécies não inibiram significativamente o crescimento micelial, a esporulação e a germinação dos esporos, porém houve efeito inibitório sobre a formação de apressório. O óleo essencial apresentou efeito inibitório sobre o crescimento micelial, esporulação, germinação de esporos e formação de apressório. No ensaio “in vivo”, os EBA não

controlaram a doença e também não alteraram a atividade da peroxidase. No parâmetro redução de peso de frutos, os EBA foram semelhantes à testemunha positiva, porém menor redução de peso dos frutos foi verificada com o EBA de *C. martinii* a 10%.

Palavras-chave: pimentão, pós-colheita, resistência induzida, controle alternativo de doenças de plantas.

## ABSTRACT

CARVALHO, Joseane Biso de, M. S., Universidade Estadual de Maringá, fevereiro de 2006. **Fungitoxic potential of *Cymbopogon citratus* and *Cymbopogon martinii* to *Colletotrichum* sp. and postharvest protection bell pepper fruits.** Adviser: Kátia Regina Freitas Schwan-Estrada. Committee Member: João Batista Vida.

Anthracoze of the bell pepper has provoked raised losses for the culture in the postharvest, where the disease is more severe. The use of alternative methods of postharvest disease control has been intensified, a time that if searches the reduction of the use of pesticides, and the use of medicinal plants can be an alternative in the diseases control. With the objective to verify the “in vitro” fungitoxic potential of the *Cymbopogon citratus* and *Cymbopogon martinii* and in the alternative control of *Colletotrichum* sp. in bell pepper postharvest. In “in vitro” test, concentrations of 1, 5, 10, 15, 20, 25 e 50% of the crude extract (CE) autoclaved of the two species were incorporated into PDA and aliquots of 1, 20, 40 and 60  $\mu\text{L}$  of the essential oil (EO) were distributed on PDA surface, to evaluate the micelial growth. It was evaluated the sporulation for the counting of spores in hemacytometer, and the spores germination and apressorio formation in ELISA too. In “in vivo” test, green pepper fruits were inoculated with spores suspension ( $1 \times 10^5$  spores.mL<sup>-1</sup>) and treated with 10 and 20% CE prepared for microwaves irradiation, and with citric extract (positive control), 2 days after inoculation. The parameters were evaluated fruits weight reduction, disease severity and general and specific activity of peroxidases. The CE of the two species not significantly inhibited the micelial growth, the sporulation and the spores germination, however it had inhibitory effect on the apressorio formation. The essential oil presented inhibitory effect on the micelial growth, sporulation, spores germination and apressorio formation. In “in vivo” test, the disease was not controlled for the CE, and the

peroxidase activity was not verified. In the parameter fruits weight reduction, the CE had been similar to the positive control, however smaller fruits weight reduction was verified with *C. martinii* CE 10% concentration.

Key words: bell pepper, postharvest, resistance induced, alternative control of plant diseases.

## 1. INTRODUÇÃO

A produção de frutas e hortaliças têm aumentado consideravelmente em todo o mundo, incluindo o pimentão (*Capsicum annum*). Apesar de ser amplamente produzido para consumo “in natura”, estima-se que as perdas em pós-colheita possam atingir até 10% a nível mundial. Estas perdas podem ser de ordem qualitativa e quantitativa, podendo ter causas diversas, variando de região para região, sendo ocasionadas por deteriorações fisiológicas, injúrias mecânicas, pragas, e principalmente por doenças (OLIVEIRA et al., 2004).

A antracnose causada por *Colletotrichum* sp. é uma das doenças mais comuns e severas para a cultura do pimentão, ocorrendo principalmente nos frutos e quando o cultivo é em períodos quentes e úmidos. Os danos são diretos à produção e comercialização, levando à depreciação e redução da qualidade, com conseqüente prejuízo ao produtor rural, causando perdas de até 100%, em um período relativamente curto. O controle da antracnose no pimentão é geralmente feito com fungicidas ou utilizando variedades resistentes, porém, nenhum programa de melhoramento tem se concentrado nessa doença e o uso de fungicidas em pós-colheita é bastante restrito (KUROZAWA & PAVAN, 1997).

A redução de doenças em pós-colheita é um dos grandes desafios para minimizar as perdas. Atualmente, este controle tem sido à base de fungicidas, e em menor escala, de tratamentos físicos associados ao controle químico. No entanto, a crescente exigência por produtos vegetais de qualidade, livres de contaminação por microrganismos e resíduos químicos, restringe o uso de defensivos agrícolas em pós-colheita, e com isso tem incrementado o desenvolvimento de pesquisas que buscam métodos alternativos químicos, físicos e biológicos para controlar as podridões pós-colheita (MARI & GUIZZARDI, 1998).

Dentre os métodos de controle que vêm sendo estudado, considerável atenção está sendo dada àqueles que promovam a indução de resistência (OLIVEIRA et al., 2004). A indução de resistência consiste na ativação de

mecanismos de defesa latentes e existentes na própria planta. Antagonistas, isolados não patogênicos, compostos sintéticos e naturais, tratamento térmico, radiação ultravioleta e atmosfera modificada têm demonstrado resultados positivos como elicitores de resistência em frutas e hortaliças na pós colheita.

Com isso, para tentar amenizar a situação de danos ambientais e contaminação humana por resíduos de defensivos agrícolas, métodos alternativos ao controle químico têm sido sugeridos como opção ao controle de fitopatógenos na pós-colheita, intensificando-se o desenvolvimento de novos fungicidas mais seguros e biodegradáveis à base de produtos naturais como extratos de plantas, microrganismos não patogênicos e leveduras, que forneçam boa eficiência com menor impacto ambiental e risco à saúde humana e animal.

Diante do exposto, o presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar o efeito antimicrobiano direto do extrato bruto aquoso (EBA) e do óleo essencial (OE) de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. (capim limão) e *C. martinii* (Roxb.) J.F. Watson (palmarosa) no crescimento micelial, esporulação, germinação de esporos e formação de apressórios por *Colletotrichum* sp., bem como verificar o efeito dos EBAs no controle de *Colletotrichum* sp. e na atividade da enzima peroxidase em frutos de pimentão.



## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Patossistema Pimentão (*Capsicum annuum* L.) x *Colletotrichum* sp.

#### 2.1.1. A cultura do pimentão (*Capsicum annuum* L.)

Pertencente à família das Solanáceas, a espécie *Capsicum annuum* é tipicamente de origem americana, ocorrendo formas silvestres desde o sul do Estados Unidos até o norte do Chile. Entretanto, atualmente têm sido cultivada desde regiões tropicais até as regiões temperadas (CASALI & COUTO, 1984; FILGUEIRA, 2000).

A espécie *Capsicum annuum* engloba tanto as pimentas como os pimentões e poucos cultivares ornamentais, sendo a mais cultivada e a que apresenta maior variabilidade genética (CASALI & COUTO, 1984). Os frutos de pimentão apresentam-se em forma de baga oca, de formato cônico ou cúbico, de coloração vermelha, amarela ou outras cores quando maduro, com ausência de sabor picante e pungente, o que os diferenciam das pimentas, devido à ausência do alcalóide capsicina (FILGUEIRA, 2000).

No Brasil, anualmente, a cultura ocupa uma área em torno de 12.000 ha para o seu cultivo, com produção estimada de 280.000 toneladas de frutos. A maioria dos estados brasileiros são produtores, porém, a maior produção está concentrada nos estados de São Paulo e Minas Gerais, que são responsáveis pelo plantio de 5.000 ha e produção de 120.000 toneladas, aonde somente o mercado de sementes movimenta 1,5 U\$\$ milhão (RIBEIRO & CRUZ, 2003). A produtividade média da cultura gira em torno de 30 a 50 toneladas.ha<sup>-1</sup>, e com a introdução de novos híbridos a tendência é elevar cada vez mais (FILGUEIRA, 2000). Além disso, produtividades mais elevadas podem ser alcançadas com a cultura quando cultivada em estufa.

Além do consumo *in natura* dos frutos, o pimentão pode ser processado e industrializado na forma de páprica – um pó vermelho obtido da desidratação e moagem de frutos maduros de cultivares especializados, com intensa coloração vermelha, onde é largamente utilizado na indústria de alimentos, especialmente em sopas desidratadas e molhos (FILGUEIRA, 2000).

Segundo Medina (1984), a temperatura ideal para armazenamento do pimentão varia de 7 a 10 °C, abaixo de 7 °C está sujeito à injúria provocada pelo frio causando um distúrbio fisiológico, e acima de 10 °C, o processo de maturação é acelerado levando a alterações na coloração dos frutos, além de aumentar a suscetibilidade a podridões. Porém, mesmo estando dentro do padrão de temperatura recomendado, a longevidade dos pimentões não ultrapassa duas a três semanas. Para Sigrist (1983), as principais causas de perdas pós-colheita para o grupo das hortaliças de frutos imaturos (pimentão, abobrinha, quiabo, berinjela, vagem e pepino) são: superamadurecimento na colheita, perda de água (murchamento), esfoladuras e danos mecânicos, distúrbio fisiológico pelo frio e deterioração microbiana.

Os pimentões podem trazer do campo uma carga elevada de microrganismos, que dependendo do manuseio ao qual o produto é submetido, tendem a multiplicar-se, e conseqüentemente, provocar a deterioração dos frutos. A temperatura e umidade relativa elevada favorecem o desenvolvimento de doenças pós-colheita, e alguns desses patógenos somente encontram condições favoráveis para o seu estabelecimento após o enfraquecimento dos tecidos vegetais pela ação do processo de maturação e/ou senescência ou pela ação da injúria provocada pelo frio. Para a maioria dos patógenos que ocorrem na pós-colheita recomenda-se o tratamento por imersão em água clorada (100 a 200 ppm de cloro livre) por 1 a 3 minutos, e para patógenos com infecção latente, como é o caso da antracnose, recomenda-se tratar os frutos com fungicidas sistêmicos (BARROS et al., 1994).

## 2.1.2. Antracnose do pimentão

A antracnose causada por *Colletotrichum* sp. é a mais comum e destrutiva doença das solanáceas, principalmente no período quente e úmido (LOBO JUNIOR. et al. (2001). No entanto, a maioria das cultivares brasileiras são derivadas da cultivar Cascadura, altamente suscetível à *C. gloeosporioides*, o que faz com que as variedades e híbridos comerciais de *Capsicum* não sejam resistentes à doença (HENZ et al., 1993).

*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. [teleomorfo: *Glomerella cingulata* (Stonem.) Spaud. & Von Schrenk) é um dos agentes causais descritos na literatura para a antracnose em pimentão (*Capsicum annuum* L.) (KUROZAWA & PAVAN, 1997). No entanto, Rawal et al. (1989) cita que a antracnose é uma doença causada por várias espécies de *Colletotrichum*, onde *C. acutatum*, *C. coccodes*, *C. dematium* e *G. cingulata* têm sido identificadas por Oh et al. (1999) como espécies causadoras de antracnose na Coreia, e *C. capsici* e *G. cingulata* em Taiwan por Manandhar et al., (1995a, 1995b).

No Brasil, *C. capsici* é considerado um fungo quarentenário nas culturas da manga, mamão e pimentão (FELIX et al., 2003). Tozze Junior et al., (2004) caracterizaram morfológica e molecularmente isolados de pimentão, pimenta e jiló, e os resultados indicaram a presença de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* causando antracnose em solanáceas no Brasil. No Brasil, a presença dessa doença é evidente desde o Rio Grande do Sul até o Nordeste, em regiões elevadas dos estados de Minas Gerais e Goiás, afetando as culturas do pimentão, berinjela e jiló (KUROZAWA & PAVAN, 1997).

A doença ocorre principalmente nos frutos, causando podridões com lesões em forma de depressões circulares de coloração escura, com diâmetro variável, de onde emerge a massa de esporos de coloração rosa-salmão (KUROZAWA & PAVAN, 1997), podendo aparecer durante todo o desenvolvimento da cultura ou somente na pós-colheita. Estas lesões depreciam os frutos e reduzem a qualidade destes para a comercialização, provocando perdas diretas para o produtor rural (HALFELD-VIEIRA et al., 2004).

Além disso, o patógeno pode sobreviver em sementes infectadas, restos culturais e em hospedeiros alternativos, e as sementes constituem-se em fonte de inóculo responsável pela introdução do patógeno em áreas indenes (KUROZAWA & PAVAN, 1997).

## **2.2. Controle de doenças em plantas**

O controle químico, apesar de suas implicações, ainda é o método mais utilizado na agricultura, tanto por solucionar o problema em curto prazo, como o fato de ser o único método disponível e relativamente eficiente para o controle de determinados patógenos. Porém, o uso intensivo de fungicidas aliado ao surgimento de raças resistentes, aos impactos ambientais negativos, às questões de saúde humana e animal, às dificuldades técnicas e econômicas do emprego do controle biológico em controlar doenças, têm aumentado o interesse em desenvolver pesquisas com o intuito de melhorar as técnicas alternativas de controle, visando a sustentabilidade do sistema agrícola (BETTIOL, 1997).

Além do controle biológico e do uso da resistência genética para controle de doenças em plantas, as substâncias naturais extraídas de plantas estão sendo bastante difundidas, uma vez que geralmente apresentam propriedades antimicrobianas (ZAMBONELLI et al., 1996). Nesse sentido, as plantas da flora tropical, podem ser uma fonte em potencial de fungicidas naturais e têm apresentado alta eficiência sobre microrganismos fitopatogênicos (ANSARI, 1996; DIXIT et al., 1995).

Em função do uso de produtos químicos oferecer sérios riscos à saúde humana e animal e causar danos preocupantes ao meio ambiente, associado ainda ao surgimento de raças resistentes dos patógenos, se faz necessário o desenvolvimento de novas estratégias na proteção de plantas tanto contra doenças, quanto a insetos e plantas daninhas. Com isso, o uso de extrato bruto ou óleo essencial obtido das plantas medicinais é prática que vem sendo bastante pesquisada em alguns patossistemas, a fim de verificar sua toxicidade direta sobre o patógeno e/ ou indução de resistência no hospedeiro, indicando a presença de

algum componente (s) antimicrobiano (s) ou com característica (as) elicitora (as) de resposta de defesa nas plantas.

### **2.2.1. Controle alternativo de doenças pós-colheita**

As frutas e hortaliças são produtos altamente perecíveis, especialmente na fase de pós-colheita, quando consideráveis danos (doenças, desordens fisiológicas, senescência) podem ocorrer. Métodos adequados de armazenamento, capazes de retardar o amadurecimento e reduzir o desenvolvimento de patógenos podem prevenir ou pelo menos reduzir estes danos. Os tratamentos com agentes químicos podem assegurar proteção para os produtos colhidos, porém, é permitido somente para algumas espécies; e a opinião pública demanda pela redução do uso dos químicos (MARI & GUIZZARDI, 1998).

O uso indiscriminado de agentes químicos pode selecionar raças insensíveis do patógeno aos fungicidas (SPOTTS & CERVANTES, 1986) e doenças iatrogênicas (GRIFFITHS, 1981), e isso tem contribuído para o aumento do interesse ao desenvolvimento de métodos alternativos para controlar fitopatógenos, capazes de integrar ou minimizar o uso dos fungicidas sintéticos.

A fase de pós-colheita é bastante favorável à aplicação de métodos de controle biológico, uma vez que parâmetros ambientais considerados restritos como a temperatura, umidade relativa e a composição gasosa da câmara de armazenamento podem ser alteradas (MARI & GUIZZARDI, 1998). A exploração da bioatividade antimicrobiana e/ou elicitora de defesa utilizando compostos secundários presentes no extrato bruto ou óleos essenciais de plantas medicinais, constitui-se em mais uma forma potencial para controle de doenças em plantas cultivadas. Dentro desse enfoque ecológico, inclui-se o controle biológico e a indução de resistência, exceto o controle químico tradicional e o melhoramento genético (BETTIOL, 1991, SCHWAN-ESTRADA, 2003; SCHWAN-ESTRADA & STANGARLIN, 2005).

O controle biológico é definido como o controle de um microrganismo patogênico por um outro microrganismo antagônico, atuando por meio de antibiose, parasitismo, competição, predação ou hipovirulência (COOK & BAKER, 1983).

A indução de resistência (ou indução de proteção, imunidade adquirida, ou resistência sistêmica adquirida ou induzida) envolve a ativação de mecanismos de defesa latentes existentes nas plantas em resposta ao tratamento com agentes bióticos ou abióticos (HAMMERSCHMIDT & DANN, 1997). Como agentes bióticos citam-se os microrganismos inativados, ou não patogênicos, microrganismos antagonistas como bactérias e leveduras, e extratos vegetais; e abióticos que se dividem em químicos como ácido 2,6-dicloroisonicotínico (INA), acibenzolar-S-metil (ASM), jasmonatos, quitosana, fosfitos, e em físicos como radiação ultravioleta, tratamento térmico e atmosfera modificada (OLIVEIRA et al., 2004; KUĆ, 2001; OOSTENDORP et al., 2001). Os mecanismos de defesa que as plantas utilizam para se defender podem ser de ordem estrutural, como as papilas, lignificação e tilose, ou bioquímica, como o acúmulo de fitoalexinas, proteínas relacionadas à patogênese ( $\beta$ -1,3 glucanase e quitinase), enzimas oxidativas (peroxidase e polifenoloxidase), enzimas envolvidas no metabolismo secundário como a fenilalanina amônia-liase (síntese de compostos fenólicos e algumas fitoalexinas) e atuação das espécies reativas de oxigênio na explosão oxidativa (STANGARLIN, 2003).

Em pós-colheita, a resistência sistêmica induzida (RSI) têm sido ressaltada como tecnologia alternativa ao uso de fungicidas no controle de doenças, e comprovada em respostas sistêmicas resultantes do tratamento com agentes biológicos, químicos e físicos. O potencial do uso de substâncias naturais extraídas de plantas como compostos antimicrobianos em produtos pós-colheita, depende muito da toxicidade aos mamíferos que tem de ser baixa e do grau de volatilização para poderem ser utilizadas na forma de fumigação na refrigeração dos produtos ou na própria prateleira na fase de comercialização do produto, não sendo permitido o uso caso a substância seja fitotóxica (MARI & GUIZZARDI, 1998).

A pesquisa vem constatando o controle direto do patógeno em frutas e hortaliças, pelo tratamento com óleos essenciais e extratos de plantas, CO<sub>2</sub>, radiação UV, elicitores químicos e bióticos. Franco & Bettiol (2000) verificaram que bicarbonato de sódio a 1, 2 e 3%, carbonato de sódio a 1%, ácido bórico a 1 e 2%, sorbato de potássio a 1%, metabissulfito de sódio a 1%, alanina a 1%, glutamato monossódico a 1% e *Gliocladium roseum* (8,6 x 10<sup>6</sup> esporos.mL<sup>-1</sup>) apresentaram-se mais eficazes no controle direto de *Penicillium digitatum* em frutos de laranja “Pêra” dentre os diversos produtos aplicados, com eficiência semelhante aos fungicidas tiabendazole, procloraz e imazalil. Gomes et al. (2005) observaram que a aplicação de microrganismos antagônicos como a *Rhodotorula* sp. e *Pseudomonas* sp. juntamente com o cloreto de cálcio reduziu a severidade da podridão mole causada por *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* em frutos de tomate na pós-colheita, porém, somente verificando os efeitos diretos destes microrganismos sobre a bactéria, deixando de lado os efeitos indiretos no controle.

### **2.2.2. Indução de resistência em plantas a fitopatógenos**

A resistência da planta pode ser definida como a capacidade da planta em atrasar ou evitar a entrada e/ou subsequente atividade de um patógeno em seus tecidos (PASCHOLATI & LEITE, 1995). Como a maior parte dos organismos eucarióticos, as plantas se defendem dos agentes fitopatogênicos com um arsenal de mecanismos de defesa induzíveis, onde todos os agentes fitopatogênicos, incluindo vírus, bactérias, fungos e nematóides, podem ativar mecanismos de defesa nas plantas (CASTRO, 1999). Esses mecanismos podem ser passivos ou pré-formados, e ativos ou pós-formados; onde se incluem os fatores estruturais que atuam como barreira física, impedindo a entrada do patógeno e colonização dos tecidos, e os fatores bioquímicos, que ocorrem nas células do hospedeiro produzindo substâncias tóxicas ao patógeno ou criando condições adversas ao crescimento deste no interior da planta (PASCHOLATI & LEITE, 1995).

O mecanismo de indução e amplificação da resposta de defesa em plantas é chamado de elicitação (ou eliciação), cujas moléculas que induzem esse fenômeno são chamadas de elicitoras (ou eliciadoras), podendo ser de origem protéica, lipídica ou polissacarídica (CASTRO, 1999).

Um dos primeiros relatos sobre indução de resistência em plantas foi descrito por Ross (1961) que demonstrou que a resistência sistêmica adquirida foi ativada em plantas de fumo após infecções locais com o vírus do TMV, e isso fez com que diminuísse a severidade dos sintomas em infecções secundárias por outros patógenos. Geralmente, a resistência induzida ocorre de forma sistêmica, uma vez que a capacidade de defesa é aumentada, não somente na infecção primária em certas partes da planta, mas também em partes não infectadas; e devido a esta característica, a resistência induzida, foi então denominada de resistência sistêmica adquirida ou SAR (OOSTENDORP et al., 2001).

A resistência sistêmica induzida (ISR – Induced Systemic Resistance) em plantas, definida por Kuć (2001) é um fenômeno pelo qual a resistência a doenças infecciosas é induzida sistemicamente por infecções localizadas ou pelo tratamento com componentes ou produtos microbianos, ou por diversos grupos de compostos orgânicos e inorgânicos estruturalmente não relacionados. A atividade dos agentes indutores não é, devido à atividade antimicrobiana ou à habilidade para serem transformados a agentes antimicrobianos. No entanto, os agentes antimicrobianos também podem induzir resistência e oferecer proteção até a ISR ser expressa. Alguns destes compostos são antimicrobianos diretos, enquanto outros somente restringem o desenvolvimento de patógenos pela formação de barreiras.

O processo pelo qual a planta torna-se resistente é extremamente ativo onde eventos ocorrem simultaneamente e compostos são sintetizados e acumulados para contribuir na resistência, e a planta é sensibilizada após a infecção, para mais tarde responder à este estímulo com respostas de defesa (KUC, 2001). Os compostos acumulados são estruturalmente não relacionados e variam de biopolímeros a inorgânicos. Estes podem já existir na planta (passivos) e/ ou estarem envolvidos em respostas da própria resistência como as ceras,



cutina, glicosídeos fenólicos, fenóis, quinonas, glicoalcalóides esteróides, suberina, terpenóides e proteínas (tionina); ou ainda podem ser sintetizados e acumulados em maior quantidade após a infecção, como as fitoalexinas, espécies reativas de oxigênio/radicais livres, cálcio, silicone/silicatos, polifenoloxidasas, peroxidases, polímeros fenólicos ligados e incrustados no interior da parede celular, glicoproteínas ricas em glicina e hidroxiprolina, tioninas, proteínas antimicrobianas e peptídeos, quitinases,  $\beta$ -1,3 glucanases, ribonucleases, proteases, calose, lignina, lipoxigenases e fosfolipases (PASCHOLATI & LEITE, 1995; KUĆ, 2001). Esses fatores são determinados geneticamente e são efetivos dependendo da expressão dos mesmos no momento certo, em magnitude adequada e em uma seqüência lógica, após o contato com o hospedeiro (PASCHOLATI & LEITE, 1995).

Uma interação gênica ocorre simultaneamente a tudo isso, onde os genes responsáveis pelos mecanismos de resistência são ativados em condições especiais para tornar as plantas mais resistentes ao ataque de patógenos. A expressão coordenada de um grupo complexo de genes, mais conhecidos como “genes pr” ou “genes sar” codificam a síntese das proteínas relacionadas à patogênese (proteínas PR) e permitem o acúmulo associado dessas, e isso tem sido considerado como a base molecular da ISR-Induced Systemic Resistance (CONRATH et al., 2001, OOSTENDORP et al., 2001). As atividades enzimáticas de diversas proteínas PR têm sido identificadas, onde inclui-se as  $\beta$ -1,3 glucanases (PR-2), quitinases (PR-3, -4, -8 e -11), semelhante à tomatina (PR-5), peroxidase (PR – 9) e inibidoras de proteinases (PR-6), e as com propriedades bioquímicas desconhecidas (PR-1) (OOSTENDORP et al., 2001; VAN LOON, 1997). Algumas dessas enzimas, como as quitinases e  $\beta$ -1,3 glucanases, hidrolisam os componentes da parede celular microbiana.

As plantas podem ser induzidas localmente e sistemicamente a tornarem-se mais resistentes a doenças, utilizando-se de diversos agentes bióticos ou abióticos, à distância do ponto de aplicação do indutor e penetração do patógeno, conforme Pascholati & Leite (1995) e Oostendorp et al. (2001), e o efeito protetor

pode durar desde poucos dias até algumas semanas ou até mesmo por todo o período de vida da planta, não existindo especificidade na resistência induzida.

A proteção induzida depende do intervalo de tempo entre o tratamento inicial (tratamento indutor) e a subsequente inoculação do patógeno (tratamento provocador ou desafiador). Essa dependência indica que mudanças específicas no metabolismo da planta estão envolvidas na síntese e/ou acúmulo de substâncias importantes no fenômeno da resistência induzida como já foi dito anteriormente PASCHOLATI & LEITE (1995) e BONALDO et al (2005).

Alguns produtos sintéticos foram descobertos e imitam a ativação biológica da SAR por patógenos necrotróficos, e poucos têm conseguido a comercialização como o acibenzolar-S-metil, o composto mais estudado como ativador de resistência, que em baixas doses pode ativar respostas de defesa em diversas culturas contra um amplo espectro de doenças incluindo bacterianas, fúngicas e viróticas. Além da molécula do acibenzolar-S-metil, temos o ácido salicílico (AS), o ácido 2,6-dicloroisonicotínico (INA), o probenazole (Oryzemat), o ácido  $\beta$ -aminobutírico (BABA), os derivados do ácido ciclopropano carboxílico (carpropamide e WL 28325), sais de fosfato e potássio, e fosetyl de Al que também podem ser utilizados como indutores de resistência (OOSTENDORP et al., 2001, SOBRINHO et al., 2005).

A formulação aquosa à base de *Reynoutria sachalinensis* (extrato formulado conhecido como Milsana<sup>®</sup>) para controle de oídio (*Sphaerotheca fuliginea*) em pepino apresentou um rápido e distinguível acúmulo de compostos fenólicos fungitóxicos nas folhas tratadas, principalmente em folhas infectadas, e uma inibição quase que imperceptível da germinação conidial, único efeito direto de Milsana<sup>®</sup> sobre *S. fuliginea*. Esses resultados então suportam a hipótese de que o produto Milsana<sup>®</sup> pode agir indiretamente por indução de reações de defesa das plantas (DAAYF et al., 1995).

O Ecolife40<sup>®</sup> (extrato cítrico) é uma formulação comercial obtida industrialmente por extração e/ou fermentação de um substrato derivado de plantas cítricas, constituída por ácidos ascórbico, cítrico e láctico, flavonóides e fitoalexinas cítricas (QUINABRA, 2005; SOBRINHO et al., 2005), que apresenta

ação sinérgica, melhorando o vigor e a resistência das plantas às doenças, onde sua ação é comandada pelos bioflavonóides cítricos (vitamina P), fitoalexinas cítricas e ácido ascórbico (vitamina C). Os tecidos das plantas são induzidos a sintetizar fitoalexinas, as quais são utilizadas na redução dos danos causados por bactérias e fungos. Os ácidos orgânicos (Ascórbico, cítrico e láctico) e os bioflavonóides conferem ao produto uma ação antioxidante, que junto com os peptídeos atuam como microbiostáticos, auxiliando no equilíbrio da flora microbiana vegetal. Motoyama et al. (2003) citam que o extrato cítrico apresentou atividade antifúngica “in vitro” contra os fungos *Colletotrichum lagenarium* e *Fusarium semitectum*, além de apresentar atividade elicitora, induzindo a síntese das fitoalexinas gliceolina em cotilédones de soja e deoxiantocianidinas em mesocótilos de sorgo.

Hanada et al. (2004) utilizaram 100 mg de ingrediente ativo.L<sup>-1</sup> de extrato cítrico e verificaram que essa concentração inibiu completamente a germinação de esporos de *Mycosphaerella fijiensis*, agente causal da Sigatoka Negra da bananeira (*Musa* spp.), e tratando os frutos colhidos, com 100 e 200 mg.L<sup>-1</sup>, via pulverização ou imersão, observaram que estas concentrações também foram eficazes no controle da doença.

A resistência induzida em frutas e hortaliças tem seguido o mesmo conceito geral da indução de resistência empregada em plantas cultivadas, que pode ser aumentada pela modulação dos mecanismos naturais de defesa. A ativação de respostas de defesa em pós-colheita tem sido demonstrada em várias interações patógeno-hospedeiro, pela aplicação de elicitores bióticos e abióticos (CAMILI et al., 2005). Segundo Dantas et al. (2004), os tratamentos com Acibenzolar-S-Metil (ASM) e Agromos (AM) foram eficientes no controle de antracnose em frutos de mamão, podridão de *Lasiodiplodia* e Podridão de *Fusarium*. Além disso, foram observados aumentos na atividade de  $\beta$ -1,3 glucanase em ambos os tratamentos, coincidindo com as reduções na incidência de antracnose. Porém, a atividade dessa enzima individualmente pode não ser a principal responsável pela resistência sistêmica adquirida, uma vez que ela age

geralmente em sinergismo com a quitinase e outros mecanismos de defesa das plantas isolados ou em conjunto.

Em tecidos de pimentão tratados com quitosana foram observados acúmulos de quitinase,  $\beta$ -1,3 glucanase e quitosanases, permanecendo com níveis elevados até 14 dias após a eliciação (EL GHAOUTH et al., 1997). As atividades das enzimas hidrolíticas foram seguidas por uma redução substancial do conteúdo de quitina na parede celular das hifas de *Botrytis cinerea*. A natureza sistêmica dessas enzimas é persistente nos tecidos elicitados pela quitosana, tornando-se ativas quando a resistência dos tecidos é reduzida no processo do amadurecimento (WILSON et al., 1994). A natureza sistêmica e persistente da quitosana pode ser importante para retardar o surgimento de infecções quiescentes, onde muitas das doenças pós-colheita se enquadram, tornando-se ativas quando a resistência do tecido diminui. Os efeitos da quitosana têm sido atribuídos à atividade antifúngica direta, efeito sobre a atmosfera modificada e/ou indução de resistência em pós-colheita (EL GHAOUTH et al., 1997).

#### **2.2.2.1. Peroxidases**

As peroxidases são consideradas proteínas da membrana do grupo das oxiredutases, e são ativadas quando a membrana é danificada por agentes mecânicos ou ação de enzimas proteolíticas. O estudo das peroxidases (glicoproteínas) têm sido de grande importância para avaliar as interações patógeno-hospedeiro (HAMMERSCHMIDT et al., 1982) e sua ação no processo de deterioração oxidativa de frutas e hortaliças, durante o armazenamento (CLEMENTE & PASTORE, 1998).

Essas enzimas catalizam a oxidação de componentes em peróxido de hidrogênio ou hidroperóxidos orgânicos, podendo estar envolvidas em diferentes processos fisiológicos tais como a biossíntese de lignina, biossíntese de etileno e degradação do ácido indol-acético. Entretanto, sua maior importância na indução de resistência em plantas contra fitopatógenos está centrada no processo de lignificação, onde participa na etapa final da síntese de lignina, fazendo a

polimerização dos álcoois hidroxicinâmicos na presença de peróxido de hidrogênio, contribuindo para a restrição do microrganismo patogênico (OLIVEIRA et al., 1997; LUSSO & PASCHOLATI, 1999).

O aumento da sua atividade é maior em cultivares resistentes ou em plantas tratadas com indutores do que em interações compatíveis, em cultivares suscetíveis ou moderadamente resistentes (OLIVEIRA et al., 1997). Entretanto, essas enzimas não apresentam uma relação direta com a RSA/RSI, mesmo ocorrendo aumento da atividade simultaneamente pode não ocorrer indução de resistência aos patógenos (MONTALBINI et al., 1995; DALISAY & KUĆ, 1995; DI PIERO & PASCHOLATI, 2004), e portanto, não podem ser usadas como marcadores de resistência em muitos patossistemas. Para Van Loon (1976), o aumento da atividade de peroxidase é um reflexo de ocorrência de alterações metabólicas que está associado com a resistência induzida, entretanto, não é a única enzima ou mecanismo responsável pela resistência desenvolvida nas plantas. A efetividade das respostas de defesa deve seguir uma ordem cronológica (PASCHOLATI & LEITE, 1995). Assim, a formação de papilas, aposições na parede e lignificação dos tecidos vegetais devem ocorrer antes, ou concomitantemente à penetração do patógeno, e como as peroxidases estão envolvidas na formação da lignina, espera-se que o aumento na atividade ocorra em até 48 h após a infecção.

### **2.3. Potencial de plantas medicinais no controle de doenças pós-colheita**

As substâncias produzidas pelas plantas conhecidas como medicinais apresentam funções bem específicas no vegetal. Em sua maioria, são frutos do metabolismo secundário tendo, portanto, função ligada à ecofisiologia da planta, isto é, ao relacionamento da planta com o ambiente que a envolve e às respostas metabólicas em sua fisiologia. O metabolismo secundário diferencia-se do primário basicamente por não apresentar reações e produtos comuns à maioria das plantas, sendo específico de determinados grupos (MARTINS et al., 2000).

Os princípios ativos ou compostos secundários não se distribuem de forma homogênea nos vegetais e são instáveis, onde dentro de uma mesma espécie podem existir diferentes quimiotipos ou raças químicas, ou seja, as espécies vegetais são idênticas, mas diferem quimicamente. Algumas características são bastante comuns entre eles: esses compostos não são vitais para as plantas, são a expressão da individualidade química dos indivíduos diferindo de espécie para espécie de forma qualitativa e quantitativa, e são produzidos em quantidades mínimas. Além disso, essas substâncias podem ser produzidas naturalmente pela planta, ou serem produzidas mediante a estímulos específicos. A regulação do metabolismo secundário é dependente da capacidade genética da planta em responder a esses estímulos internos ou externos, e da existência desses no momento e magnitude apropriado, de fatores ambientais (clima, tipo de solo) e fatores técnicos (cultivo, manejo, fitossanidade). Esses compostos pertencem a várias classes distintas de substâncias químicas, como alcalóides, terpenos, lignanas, flavonóides, cumarinas, benzenóides, quinonas, xantonas, lactonas e esteróides, entre outras (DI STASI, 1996; MARTINS et al., 2000) e estão distribuídos em um grande número de famílias botânicas. Muitos apresentam atividade antimicrobiana, como é o caso dos alcalóides, que são biossintetizados, a partir da via metabólica do ácido chiquímico (BENNET & WALLSGROVE, 1994).

O potencial de plantas medicinais têm sido bastante estudado desde os primórdios da civilização na medicina popular e fitoterapia, devido à descoberta de princípios ativos com ação terapêutica. Sendo assim, passou-se a estudar o uso desses princípios ativos no controle de doenças de plantas, incluindo o controle de doenças em pós-colheita. Aulakh & Grover (1968) verificaram o controle de podridões em frutos de tomate na pós-colheita com óleos de coco e de semente de algodão, onde os frutos permaneceram firmes e sadios por um período de 5 a 10 dias, além dos efeitos diretos verificados *in vitro* inibindo potencialmente a germinação dos esporos.

Thompson (1986) estudou o efeito de 40 óleos essenciais na inibição da germinação de esporos de 22 espécies de *Rhizopus*, *Mucor* e *Aspergillus*, sendo

que os óleos da casca e da folha de canela, cravo, pimenta e folha de pimenta, se destacaram dentre os demais como potentes inibidores. Segundo o autor, esses óleos essenciais podem ser considerados potentes agentes controladores de doenças, protegendo os alimentos como aditivos antifúngicos. Ranasingue et al. (2002) no Sri-Lanka também verificaram que os óleos da casca e da folha de canela (*Cinnamomum zeylanicum* L.) e cravo (*Syzygium aromaticum* L.) apresentaram efeito fungicida e fungistático “in vitro” nas concentrações de 0,03 a 0,11% (v/v) contra *Colletotrichum musae*, *Lasiodiplodia theobromae* e *Fusarium proliferatum*, agentes causais da antracnose e podridão da coroa em bananas, sendo considerados pelos autores como potentes agentes no manejo de doenças em pós-colheita para a cultura da banana.

Dixit et al. (1995) trabalhando com extrato e óleo essencial de folhas de 30 espécies de plantas superiores contra *Penicillium italicum*, agente causal do mofo azul de mandarina, observaram que vapores de *Ageratum conyzoides* exibiram maior toxicidade, inibindo completamente o crescimento micelial do fungo e os tratamentos por imersão e fumigação dos frutos foram bastante efetivos no controle da doença e não ofereceram nenhum efeito adverso na qualidade dos mesmos. Obagwu & Korsten (2003) observaram que o extrato de alho foi bastante eficiente no controle do mofo azul (*P. italicum*) e mofo verde (*P. digitatum*) em frutos de laranja das cv. Valência e Shamouti. Uma maior atividade desse extrato foi verificada quando misturado ao óleo de girassol. O tratamento com 1% do extrato junto com o óleo de girassol teve uma eficiência comparada ao fungicida utilizado como controle (500 ppm imazalil + 1000 ppm quazatine) sobre ambos os patógenos em laranjas da cv. Valência.

Os óleos essenciais de *Mentha arvensis*, *Ocimum canum* e *Zingiber officinale* exibiram atividade fungitóxica “in vitro” contra *Penicillium italicum*, agente causal de deterioração pós-colheita (mofo azul) de laranjas e limas. Os óleos segundo os autores, apresentaram aplicabilidade prática no controle da doença durante o armazenamento, aumentando a vida útil dos frutos na pós-colheita (TRIPATHI et al., 2004).

Shahi et al. (2003) trabalhando com a espécie *Cymbopogon flexuosus*, verificaram que o óleo essencial apresentava uma potente bioatividade contra um grupo dominante de patógenos pós-colheita. Além de não apresentar atividade fitotóxica em frutos de *Malus pumilo*, o óleo controlou em 100% a infecção por *Botrytis cinerea*, *Phoma violacea* e *Penicillium expansum* em pré e pós-inoculação, em concentrações de 20 e 30  $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ , respectivamente.

De acordo com Bautista-Baños et al. (2003), a quitosana junto com extratos de folhas de maçã baunilha (*Annona reticulata*), folhas e sementes de mamão apresentaram maior efeito fungistático do que fungicida nos ensaios “in vitro” contra *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causal da antracnose em frutos de mamão. A quitosana sozinha apresentou efeito fungitóxico também “in vivo” em pós-colheita, o que não foi observado com os extratos. Para Palhano et al. (2004), o óleo essencial de *Cymbopogon citratus* e o próprio citral (componente do óleo) aliado à alta pressão hidrostática apresentaram efeito inibitório na germinação de esporos de *C. gloeosporioides*, agente causal da antracnose em frutos de mamão, sugerindo o uso desse óleo essencial e da alta pressão hidrostática no controle alternativo de doenças pós-colheita.

O óleo de *Piper aduncum* no patossistema banana – *Colletotrichum musae* na pós-colheita, apresentou resultados significantes “in vitro” e “in vivo”, onde nas concentrações acima de 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  inibiram em 100% o crescimento micelial e a germinação de esporos. O óleo na concentração de 1% impediu a manifestação de sintomas de podridões em bananas pela redução da severidade e incidência da doença, com controle semelhante ao fungicida Benomil (BASTOS & ALBUQUERQUE, 2004).

Para Anthony et al. (2004), os óleos essenciais de *Cymbopogon nardus* e *Ocimum basilicum* tiveram ação fungicida em concentrações de 0,2 a 0,6% (v/v) sobre *Colletotrichum musae*, *Lasiodiplodia theobromae* e *Fusarium proliferatum*, agentes causais de podridão pós-colheita em banana, e a combinação dos dois óleos exibiram efeito sinérgico nos ensaios “in vivo”. Ainda que foram observados somente o controle curativo das doenças em pós-colheita, o trabalho



desenvolvido tentou abranger o uso das plantas medicinais para induzir resistência.

#### **2.4. Plantas Medicinais do gênero *Cymbopogon***

O grupo das plantas aromáticas que produzem óleos essenciais, abrange uma longa lista de espécies distribuídas em inúmeras famílias botânicas. A família que apresenta o maior número de espécies aromáticas é a família Lamiaceae, seguindo-se de outras menos representativas como as famílias Myrtaceae, Asteraceae, Verbenaceae e Lauraceae (CASTRO & RAMOS, 2002). A família Gramineae, atualmente denominada Poaceae, apresenta inúmeras espécies aromáticas, dentre as quais estão selecionadas três economicamente mais importantes pertencentes ao gênero *Cymbopogon*. São plantas exóticas cultivadas em diversos países para extração de óleos essenciais de uso medicinal e em perfumaria. Estas espécies são bem conhecidas como fonte de compostos disponíveis comercialmente como o geraniol, geraniol acetato, citral (neral e geraniol), citronelal, piperitona e eugenol, que são usados nas indústrias de perfumaria e outras, ou como matéria-prima para a síntese de produtos na perfumaria.

##### **2.4.1. *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.**

Erva conhecida popularmente por capim limão, capim-santo ou capim-cidró, pertence à família Poaceae. É perene, cespitosa, ereta e de porte alto (0,60 a 3,00 m de altura). Suas folhas são aromáticas, moles, basais, planas e glabras, invaginantes, paralelinérveas, com margens ásperas e cortantes, estreitas e longas (0,50 a 1,00 m de comprimento), com ápice acuminado (Figura 1). É originária da Índia e sua introdução no Brasil é muito antiga, possivelmente no tempo colonial, onde era utilizada como planta ornamental, sendo cultivada hoje em todo o país (CASTRO & RAMOS, 2002).

O rendimento em óleo essencial na espécie *C.citratu*s tem sido em torno de 0,4 a 0,6%, que é composto por citral (neral e geranial, em torno de 70%), mirceno (10%) e geraniol (2%), sendo muito usado em perfumaria para a produção de  $\beta$ -ionona (aroma de violetas), na síntese da vitamina A e como antisséptico, por sua ação fungistática (RAUBER et al., 1999). Por estas aplicações, o óleo essencial do capim-limão tem aceitação no mercado nacional e internacional e seus preços têm sido considerados compensadores, embora sua produção por hectare seja baixa (comparada a de outras gramíneas aromáticas). Além disso, essa planta ainda é usada como fixadora das margens de estradas e rodovias.



**Figura 1.** *Cymbopogon citratus* em condições de campo no Horto de Plantas Medicinais do Departamento de Agronomia da Universidade Estadual de Maringá (Fonte: Joseane B. de Carvalho).

#### **2.4.2. *Cymbopogon martinii* (Roxb.) J.F. Watson**

Também é uma espécie da família Poaceae, conhecida comumente como Palmarosa, originária da Ásia Tropical (Índia, Ceilão, Malásia). É uma planta estolonífera, formando densas e compactas touceiras, constituídas por numerosos colmos eretos, simples ou ramificados, muito semelhante a *C. citratus* e da qual se distingue, principalmente, por suas folhas largas na base, cordadas e providas de espiguetas sésseis e aristadas (CASTRO & RAMOS, 2002) (Figura 2).

Erva perene, cespitosa que atinge em torno de 0,60 a 2 m de altura, de raízes fasciculadas, abundantes, alongadas e pardo-escuras. Os colmos são numerosos, alongados, finos, semi-eretos e verde-claros. As folhas são alternas, moles, estreitas, linear-lanceoladas, com ápice agudo. A lâmina superior é verde-clara, glabra, e a inferior é verde-esbranquiçada e levemente pilosa, ereta e recurvada no ápice (CASTRO & RAMOS, 2002).

As flores são reunidas em panículas terminais de aspecto piramidal, com raios verticilados, progressivamente mais curtos com espiguetas germinadas. A espiguetas inferior é séssil, com uma flor hemafrodita; a espiguetas superior é pedicelada, encerrando uma ou mais flores unissexuais masculinas, sendo a espiguetas pedicelada de igual comprimento que a séssil, com florescimento geralmente ocorrendo em abril no sul do Brasil. Os frutos são pouco freqüentes, do tipo cariopses oblongas, contendo em seu interior, sementes.

Os componentes principais de seu óleo essencial são geraniol (75-95%) e, ainda, citral, d-linalol, 1- $\alpha$  terpineol, farnesol,  $\beta$ -ocimeno, metil-heptenona, aldeído isovalérico, aldeído fórmico e dipenteno (OLIVEIRA & AKISSUE, 1989).

É geralmente usada nas indústrias de perfume, como aromatizante, uma vez que seu óleo essencial tem odor semelhante ao das rosas.



**Figura 2.** *Cymbopogon martinii* em condições de campo no Horto de Plantas Medicinais do Departamento de Agronomia da Universidade Estadual de Maringá (Fonte: Joseane B. de Carvalho).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado entre os meses de maio/2005 a janeiro/2006 junto à área experimental do Departamento de Agronomia, Laboratório de Fitopatologia e Laboratório de Biotecnologia da Universidade Estadual de Maringá (UEM).

#### 3.1. Obtenção do isolado de *Colletotrichum* sp.

O fungo *Colletotrichum* sp. foi isolado diretamente de frutos de pimentão, com agulha hipodérmica e lupa para placas de Petri contendo meio Agar-Água 2% (AA). As placas foram incubadas em B.O.D. a  $24 \pm 2$  °C, sob fotoperíodo de 12 h, durante sete dias. Dessas placas foram feitas repicagens para placas com meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar), sendo novamente incubadas em B.O.D., a  $24 \pm 2$  °C, sob fotoperíodo de 12 h, por sete a dez dias. Após o isolamento monospórico, essas culturas foram armazenadas e conservadas em tubos de ensaio para repicagens posteriores. O isolado foi identificado ao nível de gênero, sendo denominado *Colletotrichum* sp.

#### 3.2. Obtenção do Extrato e óleo essencial de *Cymbopogon citratus* e *C. martinii*

O extrato bruto aquoso foi obtido a partir de folhas frescas das plantas, coletadas entre 10 e 14 h, pesadas e trituradas em liquidificador com água destilada por 2 min. Este homogeneizado resultante foi filtrado em gaze e em papel de filtro Whatman nº 41, obtendo-se concentrações de 1, 5, 10, 15, 20, 25 e 50% (p/v) de material vegetal (FIORI et al., 2000; BONALDO et al., 2004). Os extratos foram autoclavados a 120 °C por 20 min. Em seguida, os extratos foram

utilizados nos ensaios de inibição da germinação de esporos e formação de apressórios.

Os óleos essenciais foram obtidos pelo método de arraste a vapor ou hidrodestilação, utilizando um aparelho do tipo Clevenger, onde em um balão volumétrico foram colocados 70 g de material vegetal (folhas, flores e hastes) seco em estufa a 50°C e moído em moinho, e 1000 mL de água destilada e deionizada. O processo de extração durou em média 3 h. As alíquotas dos óleos essenciais utilizadas nos ensaios “in vitro” foram de 1, 20, 40, e 60 µL.

Nos ensaios “in vivo”, o extrato bruto aquoso de *C. citratus* e *C. martinii* foram obtidos de acordo com a metodologia descrita por Guardia et al., (2003) com algumas modificações, através da irradiação de microondas, onde em um béquer de 1000 mL adicionou-se 50 g (10%) ou 100 g (20%) de folhas frescas picadas, completando-se com um volume de 500 mL de água destilada. Essa mistura foi levada ao forno microondas à potência de 30 W, durante 5 min, e depois filtrada em gaze esterilizada.

### **3.3. Inibição do crescimento micelial e da esporulação de *Colletotrichum* sp.**

O extrato bruto aquoso foi individualmente incorporado ao meio BDA nas concentrações de 1, 5, 10, 15, 20, 25 e 50%, esterilizado em autoclave a 120 °C, durante 20 min, e vertido em placas de Petri. Após a solidificação do meio de cultivo, um disco de 0,8 cm de diâmetro de uma colônia de *Colletotrichum*. sp. com sete dias de idade, foi repicado para o centro de cada placa. As placas, em número de cinco para cada tratamento (cinco repetições), foram mantidas em B.O.D. a 24±2 °C, sob fotoperíodo de 12 h. O tratamento controle ou testemunha consistiu de placas contendo meio BDA. As avaliações foram efetuadas diariamente, mensurando-se o diâmetro das colônias (média de duas medidas diametralmente opostas), iniciando-se 24 h após a instalação do experimento até o momento em que as colônias da testemunha cresceram e atingiram 2/3 da superfície do meio de cultura.

Ao término deste bioensaio foi avaliada a esporulação do *Colletotrichum* sp. em cada tratamento nas cinco repetições. Para isto, preparou-se uma suspensão de esporos, obtida pela adição de 5 mL de água destilada na superfície da colônia, raspagem desta com alça de Drigalski e filtração em gaze estéril. O número de esporos.cm<sup>-2</sup> foi determinado através da contagem dos esporos em hemacitômetro (câmara de Neubauer) ao microscópio óptico.

Os óleos essenciais de *C. citratus* e *C. martinii* foram utilizados em ensaios semelhantes aos do EBA, com o uso de alíquotas de 1, 20, 40 e 60 µL de cada óleo essencial, esterilizado por filtração à vácuo em membrana Millipore (poros de 0,45 µm de diâmetro). Os óleos foram adicionados no centro das placas com o auxílio de pipeta micrométrica e espalhados com alça de Drigalski na superfície do meio de cultura solidificado. Em seguida, um disco de 0,8 cm de diâmetro, contendo micélio de *Colletotrichum* sp. com sete dias de idade, foi repicado para o centro de cada placa, que foi posteriormente vedada e mantida em B.O.D. a 24±2 °C, sob condições de fotoperíodo de 12 h. O tratamento controle consistiu de placas contendo meio BDA. As avaliações foram realizadas por meio de medições diárias do diâmetro da colônia (média de duas medidas diametralmente opostas), até o momento em que o crescimento do micélio das placas testemunhas atingiram 2/3 da placa. Em seguida, foi avaliada a esporulação em todas as placas de todos os tratamentos, através da contagem dos esporos em hemacitômetro no microscópio óptico, obtendo-se o número de esporos.cm<sup>-2</sup>.

#### **3.4. Inibição da germinação de esporos e formação de apressórios de *Colletotrichum* sp.**

O teste de inibição da germinação de esporos e formação de apressórios na presença dos EBA e OE foi realizado em placas de ELISA, de acordo com a metodologia descrita por Regente et al. (1997). Cada orifício da placa recebeu uma alíquota de 40 µL da suspensão de esporos de *Colletotrichum* sp. (1x10<sup>5</sup> esporos.mL<sup>-1</sup>) e outra alíquota de 40 µL de EBA, de maneira a se obter as



concentrações anteriormente descritas ou do óleo essencial (OE). No ensaio com o OE, adicionou-se 0,01% de Tween 20 para 100 mL de suspensão de esporos. A testemunha foi composta por água destilada e esterilizada e suspensão de esporos.

A placa de ELISA foi incubada em câmara úmida em B.O.D., sob temperatura de 24 °C e luz fluorescente constante. A porcentagem de germinação de esporos e formação de apressórios foi avaliada com base na contagem de 100 esporos por repetição, com cinco repetições por tratamento. Após 10 h do início do experimento, a germinação foi paralisada com uma gota de corante azul de algodão com lactofenol, e a contagem foi efetuada ao microscópio óptico em aumento de 100x. Foram considerados esporos germinados aqueles que apresentaram qualquer emissão do tubo germinativo, independente do seu comprimento.

### **3.5. Proteção de frutos de pimentão em pós-colheita**

Os frutos foram obtidos diretamente de um único produtor junto à feira do produtor nos meses de novembro e dezembro. Antes da montagem do experimento, os frutos foram primeiramente lavados abundantemente com água e sabão, enxaguados em água, banhados em solução de hipoclorito de sódio a 2%, enxaguados novamente em água, e colocados para secar.

Os tratamentos com os extratos de *Cymbopogon citratus* e *Cymbopogon martinii* nas concentrações de 10 e 20 %, e com extrato cítrico (Ecolife®) à concentração de 20 ppm foram feitos por imersão durante 1 min.

A inoculação com o fungo *Colletotrichum* sp. foi por aspersão da suspensão de esporos ( $1 \times 10^5$  esporos.mL<sup>-1</sup>) sobre ferimentos delimitados na região central do fruto, feitos com agulha hipodérmica.

Foram realizados os seguintes tratamentos: a) testemunha absoluta: não inoculada e não tratada; b) testemunha positiva: frutos somente inoculados com o patógeno; c) extrato cítrico (2 mL do produto comercial.L<sup>-1</sup>); c) extrato bruto aquoso de *C. citratus* em concentrações de 10 e 20%; e d) extrato bruto aquoso

de *C. martinii* em concentrações de 10 e 20%. Os tratamentos foram realizados dois dias após a inoculação do patógeno. Os frutos foram colocados em bandejas de plástico cobertas com filme plástico, mantidas em laboratório sob temperatura de  $25 \pm 5$  °C e UR de 80–90%.

A severidade da doença foi avaliada através da contagem do número de lesões, mensuração do diâmetro da lesão, do diâmetro e comprimento dos frutos, onde foi calculada a % área lesionada nos frutos, utilizando-se as fórmulas:

- Área Lesionada (AL) =  $\pi \cdot D^2/4$

- Área média do fruto (AF) = área de um cilindro reto =  $2 \cdot \pi \cdot R \cdot (h+R)$

- % área lesionada =  $AL/AF \cdot 100$ , onde:

D = diâmetro da lesão (cm);

R = raio do fruto, onde  $R = d/2$ ;

D = diâmetro do fruto;

h = comprimento do fruto.

A incidência da doença (%) também foi avaliada concomitantemente, através da contagem do número de frutos com sintomas da doença, e também calculada por meio da seguinte fórmula: número de frutos com sintomas/número total de frutos.100. As avaliações foram realizadas a cada dois dias, e iniciaram-se dois dias após a inoculação com o patógeno, com avaliações no 2°, 4°, 6° e 8° dia após a inoculação.

Com as avaliações de severidade da antracnose nos frutos de pimentão, calculou-se a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), por meio da seguinte fórmula:

AACPD =  $\sum [(y_i + y_{i+1})/2] \cdot [(t_{i+1} - t_i)]$ , onde:

y = intensidade da doença na i-ésima avaliação;

t = tempo no momento da i-ésima avaliação;

Outro parâmetro avaliado foi a redução de peso dos frutos com os tratamentos utilizados, através da pesagem dos frutos obtendo-se o peso inicial e o peso final, onde  $(\text{peso inicial} - \text{peso final}/\text{peso final} \cdot 100)$ , correspondeu ao percentual de redução de peso.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado (DIC) em fatorial 2 x 2 [duas espécies (E) de plantas, duas concentrações (C)], com 5 repetições, sendo cada repetição representada por uma bandeja contendo 5 frutos.

### **3.5.1. Atividade da enzima peroxidase**

Experimento semelhante ao anterior foi realizado para avaliar a atividade da peroxidase. As amostras para a análise enzimática foram retiradas com perfurador (diâmetro de 8 mm), em quatro períodos de tempo: antes da inoculação ou tratamento, 1 dia após a inoculação, 3 dias após a inoculação e 1 dia dos tratamentos, e 6 dias após a inoculação e 4 dias dos tratamentos. Cada amostra continha quatro discos obtidos aleatoriamente dos frutos. Imediatamente após as coletas, os discos foram acondicionados em potes hermeticamente fechados, mantidos em banho de gelo, sendo posteriormente, congelados e armazenados a -20 °C. As amostras vegetais foram maceradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em 3,0 mL de tampão fosfato de potássio 0,01 M pH 6,0 (tampão de extração) acrescido de 0,05 g de polivinilpirrolidona (PVP) e 1mM de EDTA em almofariz sob banho de gelo, e centrifugadas a 6500 g durante 15 min. O sobrenadante foi utilizado para avaliar a atividade da peroxidase e o teor de proteínas totais presentes nas amostras.

A análise enzimática da peroxidase foi determinada a 30 °C pelo método espectrofotométrico direto, através da mensuração da conversão de guaiacol a tetraguaiacol a 470 nm (HAMMERSCHMIDT et al., 1982). A mistura de reação consistiu de 0,1 mL de extrato protéico e 2,9 mL de substrato enzimático (250µL guaiacol 2% (v/v) e 306 µL de peróxido de hidrogênio em 100 mL de tampão de extração). A reação foi conduzida durante 5 min, com as medidas de absorbância tomadas a cada 20 s, iniciando-se logo após a adição do extrato ao substrato. A atividade das peroxidases foi determinada em espectrofotômetro a 470 nm, sendo os valores expressos em  $\Delta$  absorbância a 470 nm/min/µg proteína para atividade específica e  $\Delta$  absorbância a 470 nm/min/g peso fresco para a atividade geral da peroxidase.

### 3.5.1.1. Dosagem de proteínas e carboidratos totais das amostras

A determinação da quantidade de proteínas totais das amostras enzimáticas e dos extratos de *C. martinii* e *C. citratus* aplicados *in vivo* foi realizada pelo método de Bradford (1976). Em cubeta de quartzo com volume de 1mL adicionava-se 200  $\mu\text{L}$  de reagente concentrado de Bradford a 800  $\mu\text{L}$  da amostra, sob agitação contínua em Vortex. Em até 5 min, foi realizada a leitura de absorbância em espectrofotômetro a 595 nm, onde a concentração de proteínas de cada amostra foi expressa em  $\mu\text{g}$  equivalentes de albumina de soro bovino (ASB) pela utilização da curva padrão de concentrações de ASB variando de 0 a 20  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Figura 1A, Apêndices). Para as amostras de peroxidase, foram feitas diluições na proporção de 1:1 (v:v), onde 400  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato de potássio 0,01 M foi adicionado em 400  $\mu\text{L}$  de extrato enzimático, com duas réplicas por amostra. Para as amostras dos extratos das plantas utilizados nos ensaios “*in vivo*” não foi feita diluição, e utilizaram-se quatro réplicas por amostra.

A determinação de carboidratos totais dos extratos *C. martinii* e *C. citratus* aplicados “*in vivo*”, foi realizada pelo método da reação de fenol sulfúrico (DUBOIS, et al. 1956). A solução de reação continha 0,5 mL da amostra contendo cerca de 10 a 50  $\mu\text{g}$  de açúcar, onde adicionou-se 0,5 mL de fenol 5%, e rapidamente 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. As amostras permaneceram à temperatura ambiente por 30 min e as leituras foram feitas em espectrofotômetro utilizando cubetas de quartzo de 3 mL em absorbância de 490 nm. A concentração de carboidratos nas amostras foram expressas em  $\mu\text{g}$  de glicose pela utilização da curva padrão de concentrações de glicose variando de 0 a 100  $\mu\text{g}$  de glicose. $\text{mL}^{-1}$  (Figura 2A, Apêndices). Os extratos foram diluídos na proporção de 1:10 (v:v), onde adicionou-se 10  $\mu\text{L}$  de extrato de planta em 1000  $\mu\text{L}$  de água destilada, com quatro réplicas por amostra.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Crescimento micelial, esporulação, germinação de esporos e formação de apressórios

#### 4.1.1. Extrato bruto aquoso

A análise de variância (Quadro 1A, Apêndices) revelou que, para a variável crescimento micelial, houve efeito significativo das espécies (E), da interação espécies (E) x concentração (C) e do fatorial vs testemunha ao nível de 5% de probabilidade. No desdobramento E x C, observou-se diferença significativa entre *Cymbopogon citratus* e *C. martinii*, desde a concentração de 1% até a concentração de 25%, pelo Teste F ( $p < 0,05$ ), e pelas análises de regressão do desdobramento C x E, verificou-se que as duas espécies de *Cymbopogon* apresentaram comportamentos semelhantes, onde as curvas ajustadas para crescimento micelial apresentaram tendência linear. Entretanto, não houve diferença significativa do crescimento micelial, quando comparou-se todas as concentrações dentro das duas espécies com a testemunha, pelo Teste de Dunnett ( $p < 0,05$ ) (Quadro 1).

Os resultados indicaram que houve estímulo do crescimento micelial do fungo *Colletotrichum* sp. para as menores concentrações (1 a 15%) para *C. martinii*. Possivelmente, os extratos aquosos brutos de *C. martinii* e *C. citratus* possam ter perdido parte de suas propriedades antimicrobianas, pela degradação de seus componentes pela alta temperatura no momento da autoclavagem, restando somente os nutrientes dissolvidos nos extratos, e isso possa ter favorecido o crescimento micelial de *Colletotrichum* sp.

**Quadro 1.** Médias de crescimento micelial de *Colletotrichum* sp. isolado de pimentão em diferentes concentrações de extrato aquoso de *Cymbopogon martinii* e *Cymbopogon citratus* incorporado ao meio BDA

Tratamentos (extratos)	Crescimento micelial (cm)	
	<i>Cymbopogon martinii</i>	<i>Cymbopogon citratus</i>
Concentrações (%)		
1	7,33 <sup>ns</sup> a <sup>1</sup>	5,62 <sup>ns</sup> b
5	7,27 <sup>ns</sup> a	6,12 <sup>ns</sup> b
10	7,18 <sup>ns</sup> a	5,33 <sup>ns</sup> b
15	7,22 <sup>ns</sup> a	5,85 <sup>ns</sup> b
20	7,05 <sup>ns</sup> a	6,30 <sup>ns</sup> b
25	6,96 <sup>ns</sup> a	5,76 <sup>ns</sup> b
50	6,83 <sup>ns</sup> a	6,91 <sup>ns</sup> a
Testemunha <sup>1</sup>	7,07	
Equação de Regressão	$7,3080019 - 0,0103525 x$	$5,5542894 + 0,0240553 x$
R <sup>2</sup>	0,9027	0,5833
C.V. (%): 5,78		

Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem significativamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F

<sup>ns</sup>: não significativo em relação à testemunha pelo Teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

<sup>1</sup>contendo apenas meio BDA

A análise de variância (Quadro 2A, Apêndices) para a variável esporulação revelou diferenças significativas para a concentração, interação E x C e fatorial vs testemunha. No desdobramento E x C, foram observadas diferenças significativas entre as espécies a partir da concentração de 20% pelo Teste F ( $p < 0,05$ ), onde *C. citratus* apresentou maiores níveis de esporulação nas concentrações de 20 e 25%, e *C. martinii* a 50%. Em relação à testemunha (Teste Dunnett,  $p < 0,05$ ), houve diferenças significativas na concentração de 50% para as espécies *C. martinii* e *C. citratus*, e 20 % para a espécie *C. citratus*, porém os resultados foram de estímulo da esporulação (Quadro 2). A esporulação por *Colletotrichum* sp. também foi afetada pela inativação dos compostos fungitóxicos, devido a ação do tratamento térmico nos extratos, deixando disponíveis os nutrientes que podem

ser desde carboidratos, proteínas, sais inorgânicos, nitrogênio, microelementos até vitaminas, dissolvidos no meio. Isto pode favorecer a sobrevivência, crescimento e reprodução do patógeno, uma vez que este estará em um ambiente favorável (luz, temperatura e umidade adequados) para a realização de suas funções vitais.

**Quadro 2.** Médias de esporulação de *Colletotrichum* sp. isolado de pimentão em diferentes concentrações de extrato aquoso de *Cymbopogon citratus* e *Cymbopogon martinii* incorporado ao meio BDA

Tratamentos (Extratos)	Esporulação <sup>1</sup> (número de esporos.cm <sup>-2</sup> )			
Concentrações (%)	<i>Cymbopogon martinii</i>		<i>Cymbopogon citratus</i>	
1	77,47 <sup>ns</sup>	A	96,34 <sup>ns</sup>	A
5	134,02 <sup>ns</sup>	A	139,00 <sup>ns</sup>	A
10	142,50 <sup>ns</sup>	A	134,58 <sup>ns</sup>	A
15	117,74 <sup>ns</sup>	A	94,39 <sup>ns</sup>	A
20	125,74 <sup>ns</sup>	B	166,8 <sup>+</sup>	A
25	110,52 <sup>ns</sup>	B	153,90 <sup>ns</sup>	A
50	201,82 <sup>+</sup>	A	166,71 <sup>+</sup>	B
Testemunha <sup>2</sup>	108,83			
Equação de Regressão	97,165543+ 1,822730x		114,230602 + 1,207207x	
R <sup>2</sup>	0,6185		0,4239	
C.V. (%):	19,11			

<sup>1</sup>dados transformados por (x)<sup>0,5</sup>

Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem significativamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F

<sup>ns</sup>: não significativo em relação à testemunha pelo Teste de Dunnett a 5% de probabilidade e <sup>+</sup> significativo em relação à testemunha pelo Teste de Dunnett a 5% de probabilidade e maior que esta

<sup>2</sup>contendo apenas meio BDA

A análise de variância (Quadro 3A, Apêndices) para a germinação de esporos (%) no extrato bruto aquoso revelou diferenças significativas para as espécies (E), concentração (C), para a interação E x C e fatorial vs testemunha. Houve diferenças significativas entre as espécies pelo Teste F, através do

desdobramento da interação E x C ( $p < 0,05$ ). A análise de regressão para o desdobramento C x E revelou que diferenças significativas entre as concentrações ocorreram em cada uma das espécies. A comparação das concentrações dos extratos das duas espécies com a testemunha pelo Teste de Dunnett ( $p < 0,05$ ) revelou que a inibição da germinação foi baixa em quase todas as concentrações nas duas espécies, onde a maior porcentagem de inibição foi alcançada com a concentração de 50% na espécie *C. citratus* (29,6%) (Quadro 3). Na germinação de esporos também houve estímulo, semelhantemente como ocorreu com o crescimento micelial e esporulação. Baixa inibição da germinação de esporos ou estímulo da germinação foi verificada por diversos autores, utilizando diferentes espécies de plantas no controle “in vitro” de fungos fitopatogênicos. Cruz et al. (1998) verificaram que o extrato bruto aquoso de *C. citratus* não inibiu a germinação de esporos de *Colletotrichum graminicola*. Schwan-Estrada et al. (1998) verificaram que o extrato bruto de *Eucalyptus citriodora* nas concentrações de 5, 10, 15, 20, 25, e 50% também proporcionou estímulo na germinação de esporos, alterando morfológicamente o desenvolvimento de *C. graminicola* e aumentando a germinação e o comprimento dos tubos germinativos. Isto também foi demonstrado por Santos (1998), onde substâncias presentes nas folhas secas de *Lippia alba* alteraram o padrão de germinação dos esporos de *C. gloeosporioides*, aumentando o comprimento e a largura dos tubos germinativos em relação à testemunha. Emett & Parbery (1975) citam que as espécies de *Colletotrichum* podem responder à presença de nutrientes exógenos pelo alongamento do tubo germinativo, o que favorece o retardamento na formação de apressórios.



**Quadro 3.** Médias da germinação de esporos de *Colletotrichum* sp. isolado de pimentão, em diferentes concentrações de extrato aquoso de *Cymbopogon citratus* e *Cymbopogon martinii* autoclavado

Tratamentos (Extratos) Concentrações (%)	Germinação de esporos (%)			
	<i>Cymbopogon martinii</i>		<i>Cymbopogon citratus</i>	
1	89,42 <sup>-</sup>	B	92,72 <sup>-</sup>	A
5	95,95 <sup>ns</sup>	A	89,27 <sup>-</sup>	B
10	98,98 <sup>ns</sup>	A	81,62 <sup>-</sup>	B
15	95,62 <sup>ns</sup>	A	73,96 <sup>-</sup>	B
20	100,00 <sup>ns</sup>	A	98,50 <sup>ns</sup>	A
25	99,44 <sup>ns</sup>	A	98,12 <sup>ns</sup>	A
50	82,41 <sup>-</sup>	A	69,10 <sup>-</sup>	B
Testemunha <sup>1</sup>	98,14			
Equação de Regressão	$90,198712 + 0,877930x - 0,020690x^2$		$85,548701 + 0,555750x - 0,016917x^2$	
R <sup>2</sup>	0,9187		0,3448	
C.V. (%): 2,82				

Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem significativamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F

<sup>ns</sup>: não significativo em relação à testemunha pelo Teste de Dunnett a 5% de probabilidade e <sup>-</sup> significativo em relação à testemunha pelo Teste de Dunnett a 5% de probabilidade e menor que esta

<sup>1</sup>contendo apenas água destilada e esterilizada

A análise de variância (Quadro 4A, Apêndices) da formação de apressórios revelou diferenças significativas para as espécies (E), concentração (C), interação E x C, e fatorial vs testemunha. Para o desdobramento da interação E x C verificou-se diferença significativa entre as duas espécies em quase todas as concentrações. Através da análise de regressão, verificou-se que existem diferenças significativas dentro das concentrações nas duas espécies. Os resultados mostraram que em concentrações mais diluídas dos extratos (1% e 5%) não ocorreu inibição da formação de apressórios, ou esta foi muito baixa (Quadro 4). Entretanto, na concentração de 10% o percentual de inibição chegou a 46% para *C. martinii* e 52% para *C. citratus*, e a partir dessa concentração o percentual de inibição alcançou 85% e 90% na concentração de 50% para *C.*

*martinii* e 25% para *C. citratus*, respectivamente. A espécie *C. citratus* apresentou-se com maior potencial inibitório da formação de apressórios de *Colletotrichum* sp., uma vez que os extratos nas concentrações de 20 e 25% conseguiram inibir em 92% e 94%, respectivamente. Resultados semelhantes foram verificados por Cruz et al. (1998) onde o extrato de folhas de *C. citratus* não inibiu a germinação de esporos de *Colletotrichum graminicola*, porém a formação de apressórios foi reduzida em 27 e 95% nas concentrações de 20 e 50% do extrato bruto, respectivamente. Schwan-Estrada et al. (1998) verificaram que o extrato bruto de *Eucalyptus citriodora* além de proporcionar estímulo na germinação de esporos de *C. graminicola*, reduziu a formação de apressórios. Santos (1998) verificaram que substâncias presentes nas folhas secas de *Lippia alba* também impediram que estas estruturas fossem formadas. A presença de nutrientes pode aumentar a taxa de germinação de esporos, e mesmo em pequenas quantidades podem impedir a formação de apressórios. A inibição da formação de apressórios por nutrientes nem sempre é causada por inibidores específicos ou por concentrações inibitórias. O apressório além de permitir a fixação do patógeno no hospedeiro, se forma também para estabelecer uma relação nutricional com este, de modo que em alguns fungos, a iniciação do apressório é possivelmente uma resposta à exaustão de reservas de energia endógena, onde em alguns casos, são necessárias condições de inanição para que essas estruturas sejam formadas (EMMETT & PARBERY, 1975). No presente trabalho, os extratos das duas espécies de *Cymbopogon* apresentaram tanto carboidratos e proteínas em sua composição (Quadro 7A, Apêndices), em concentrações crescentes, favoreceram o crescimento micelial, esporulação e germinação de esporos, entretanto, inibiram ou retardaram a formação de apressórios.

Em várias espécies de fungos, a formação de apressório pode ser obrigatória para a infecção, enquanto que, em outros pode ser opcional ou desnecessária (EMMETT & PARBERY, 1975). A formação de apressório implica diretamente na infecção, uma vez que estas estruturas são importantes para a fixação do patógeno na superfície do hospedeiro, formar uma pequena hifa

denominada *peg* de penetração e perfurar a cutícula, penetrar no hospedeiro e causar a doença (AMORIM, 1995).

**Quadro 4.** Médias de formação de apressórios de *Colletotrichum* sp. isolado de pimentão em diferentes concentrações de extrato aquoso de *Cymbopogon citratus* e *Cymbopogon martinii* autoclavado

Tratamentos (Extratos) Concentrações (%)	Formação de apressórios (%)	
	<i>Cymbopogon martinii</i>	<i>Cymbopogon citratus</i>
1	59,36 <sup>+</sup> A	45,67 <sup>ns</sup> A
5	53,35 <sup>ns</sup> A	35,60 <sup>ns</sup> B
10	24,59 <sup>-*</sup> A	21,73 <sup>-</sup> B
15	15,32 <sup>-</sup> A	13,35 <sup>-</sup> B
20	14,13 <sup>-*</sup> A	3,74 <sup>-</sup> A
25	10,60 <sup>-</sup> A	2,88 <sup>-</sup> A
50	6,68 <sup>*</sup> A	4,51 <sup>-</sup> B
Testemunha <sup>1</sup>	45,60	
Equação de Regressão	62,638192 – 3,487936x + 0,047740x <sup>2</sup>	48,432911 – 2,966506x + 0,041856x <sup>2</sup>
R <sup>2</sup>	0,9346	0,9925
C.V. (%): 25,05		

<sup>1</sup>contendo apenas água destilada e esterilizada

Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem significativamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F

<sup>ns</sup>: não significativo em relação à testemunha pelo Teste de Dunnett a 5% de probabilidade e <sup>-\*</sup> significativo em relação à testemunha pelo Teste de Dunnett a 5% de probabilidade e menor ou maior que esta, respectivamente

#### 4.1.2. Óleo essencial

Utilizando óleos essenciais de *C. citratus* e *C. martinii*, observou-se inibições no crescimento micelial de *Colletotrichum* sp. com alíquota de 1 µL, em torno de 52 e 68% para *C. martinii* e *C. citratus*, respectivamente (dados não mostrados). A partir da concentração de 20 µL de óleo essencial nas duas espécies, a inibição do crescimento micelial foi de 100%. Cruz et al. (1997)

também observaram que uma alíquota de 20 µL do óleo essencial de *C. citratus* proporcionou inibição de 100% no crescimento micelial de *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora* sp. e *Sclerotium rolfsii*, e de 80% para *Alternaria alternata*. Não houve formação de esporos em nenhuma das alíquotas utilizadas. Além disso, no bioensaio de germinação de esporos e formação de apressórios, observou-se completa inibição dessas duas variáveis utilizando-se uma alíquota de 40 µL. Wilson et al. (1997) verificaram que os óleos essenciais de *C. martinii* e *C. citratus* inibiu totalmente a germinação de esporos de *Botrytis cinerea*, com eficiência até mesmo em baixas concentrações do óleo, 0,39 e 6,25%, respectivamente, destacando-se o óleo de *C. martinii* por apresentar maior eficiência. Prashar et al. (2003) verificaram que o óleo essencial de palmarosa (*C. martinii*) apresentou ação antimicrobiana contra *Saccharomyces cerevisiae*, inibindo o crescimento das células também com baixas concentrações, cujo efeito foi atribuído ao principal componente ativo presente no óleo, o geraniol. No presente trabalho, as substâncias fungitóxicas estavam presentes e não foram degradadas com o manuseio do óleo para se fazer os tratamentos, e estes foram eficientes no controle do patógeno pela inibição do crescimento micelial, esporulação, germinação de esporos e formação de apressórios com a alíquota de 40 µL.

#### **4.2. Proteção de frutos de pimentão em pós-colheita**

Para a variável redução de peso de frutos (Quadro 5A, Apêndices) houve diferenças significativas ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste F para espécie (E) e fatorial vs testemunha. A partir desses resultados, observou-se que em todos os tratamentos houve redução de peso acentuada, após 8 dias do início do experimento (Quadro 5). Entretanto, frutos tratados com EBA de *C. martinii* a 10% apresentaram menores perdas, mas não diferiram significativamente das testemunhas absoluta e positiva, e do extrato cítrico. Pelos resultados obtidos, observou-se que os extratos não foram eficientes na manutenção do peso dos frutos, o que indica que os frutos perderam água e iniciaram o processo de murchamento. A perda de água de produtos armazenados não só resulta em

perda de massa, mas também em perda de qualidade, principalmente pelas alterações na textura. Alguma perda de água pode ser tolerada, mas aquela responsável pelo murchamento ou enrugamento deve ser evitada. O murchamento pode ser retardado, reduzindo-se a taxa de respiração pelo aumento da umidade relativa do ar, diminuição da temperatura, redução do movimento do ar e uso de embalagens protetoras (BARROS et al., 1994).

**Quadro 5.** Efeito de extratos de *Cymbopogon citratus* e *Cymbopogon martinii*, após 6 dias da aplicação, no peso em frutos de pimentão na pós-colheita

Tratamentos (Extratos)	Redução de peso de frutos (%)	
	<i>Cymbopogon citratus</i>	<i>Cymbopogon martinii</i>
10%	12,86 <sup>ns</sup> A a	9,17 <sup>ns</sup> A b
20%	10,36 <sup>ns</sup> A a	10,18 <sup>ns</sup> A a
Testemunha Absoluta <sup>1</sup>		13,19
Testemunha Positiva <sup>2</sup>		12,66
Extrato cítrico <sup>3</sup>		9,94
CV %: 26,88		

Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si pelo Teste F ao nível de 5% de probabilidade

<sup>ns</sup>: não significativo ao nível de 5% de probabilidade em relação às testemunhas e Extrato cítrico pelo Teste de Dunnett

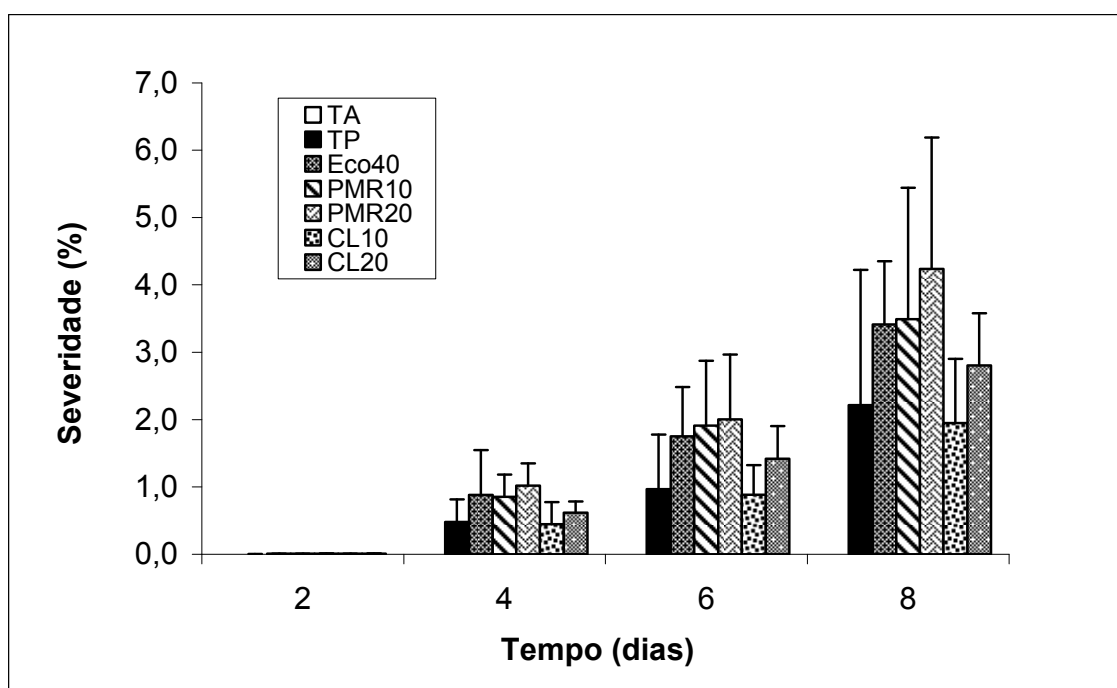
<sup>1</sup>não inoculada e não tratada

<sup>2</sup>inoculada e não tratada

<sup>3</sup>concentração de 2 mL de produto comercial/1000 mL água destilada e esterilizada

De maneira geral, os frutos de pimentão não foram protegidos pelos extratos de *C. citratus*, *C. martinii* e extrato cítrico contra antracnose causada por *Colletotrichum* sp, uma vez que avaliando-se o progresso da doença no decorrer do tempo após a inoculação e tratamentos, verificou-se que não houve decréscimo na severidade da antracnose pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade (Quadros 6 e 6A, Apêndices) e a incidência de antracnose nos frutos foi de 100% em todos os tratamentos. A severidade da doença (Figura 3)

em frutos tratados com extrato de *C. citratus* a 10% foi similar à testemunha positiva, e nos demais tratamentos foi superior, exceto para a testemunha absoluta onde não ocorreram lesões. Comportamento semelhante aos ensaios “in vitro” foram verificados na superfície dos frutos, onde os esporos de *Colletotrichum* sp. germinaram, e com os ferimentos feitos nos frutos, a penetração e a colonização ocorreram, e o controle da doença não foi efetivo pela aplicação dos extratos. A hipótese mais plausível que poderia justificar a ineficiência dos extratos no presente trabalho seria de que as substâncias com ação fungitóxica tenham sido degradadas pela ação da irradiação de microondas e aquecimento. Resultados similares foram encontrados por Röder (2003), onde extratos aquosos de *Rosmarinus officinalis* e *Ruta graveolens* a 1, 10 e 20%, extrato cítrico a 0,1, 0,25, e 0,50% e óleo de nim a 0,1, 0,25, e 0,50% não controlaram a podridão parda causada por *Monilinia fructicola* em frutos de pêssego pós-colheita. Entretanto, os extratos aquosos de *R. officinalis*, extrato cítrico e óleo de nim foram capazes de controlar a podridão causada por *Rhizopus nigricans* em morango pós-colheita. Entretanto, podem ocorrer variações no controle da doença em diferentes patossistemas como verificado por Röder (2003), onde os extratos podem não ter efeito sobre determinado patossistema, mas em outros o controle da doença pode ocorrer. Estudos posteriores devem ser feitos para tentar verificar se a irradiação de microondas e o aquecimento causado por ela interferem na ação fungitóxica desses extratos, utilizando diferentes patossistemas.



**Figura 3.** Severidade da antracnose avaliada no 2º, 4º, 6º e 8º dia após a inoculação da suspensão de esporos de *Colletotrichum* sp. ( $1 \times 10^5$  esporos.mL<sup>-1</sup>) em frutos de pimentão tratados com Extrato cítrico e extratos de *C. citratus* e *C. martinii*, dois dias após a inoculação. O tempo em dias representa o tempo após a inoculação. TA: testemunha absoluta, não tratada e não inoculada; TP: testemunha positiva, inoculada e não tratada; Eco40: extrato cítrico na concentração de 20 ppm (2 mL de produto comercial/1000 mL de água destilada); PMR 10% e PMR 20%: extrato de *C. martinii* a 10% e 20%, respectivamente; CL 10% e CL 20%: extrato de *C. citratus* a 10% e 20%, respectivamente. Para efeito de estatística, os dados foram transformados por  $(x + 1)^{0.5}$ . As barras sobre as colunas representam o desvio padrão da severidade entre as cinco repetições por tratamento.

**Quadro 6.** Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para antracnose em frutos de pimentão após seis dias da aplicação de extratos aquosos de *C. citratus* e *C. martinii*

Tratamentos	AACPD
<i>Cymbopogon citratus</i> 10%	2,56 a
Testemunha Positiva <sup>1</sup>	2,75 a
<i>Cymbopogon citratus</i> 20%	3,05 a
<i>Cymbopogon martinii</i> 10%	3,30 a
Extrato cítrico <sup>2</sup>	3,34 a
<i>Cymbopogon martinii</i> 20%	3,63 a
CV %: 19,80	

<sup>1</sup>inoculada e não tratada

<sup>2</sup>concentração de 20 ppm (2 mL produto comercial/1000mL de água destilada)

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade

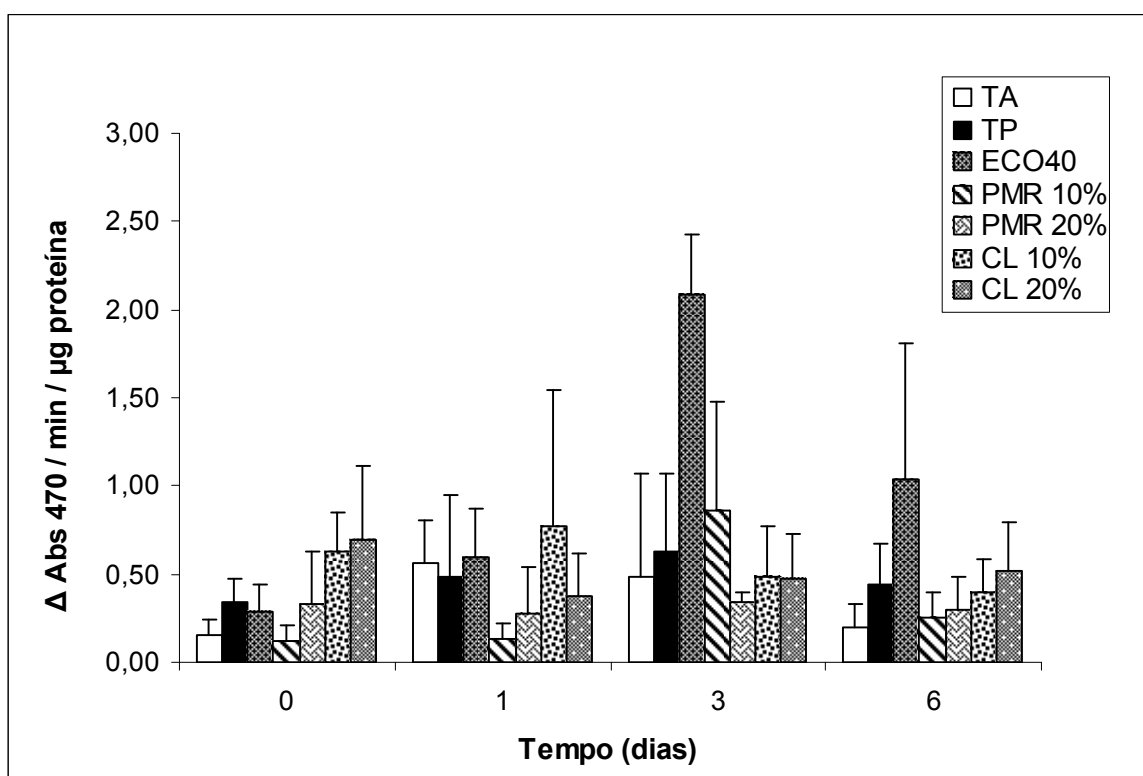
#### 4.2.1. Peroxidase

As atividades específica e geral da peroxidase apresentaram-se semelhantes, e somente houve incremento para o tratamento com extrato cítrico, (Figuras 4 e 5). A partir dos dados obtidos, verificou-se que os incrementos na atividade de peroxidase não foram suficientes para conter o desenvolvimento da doença, aferindo-se novamente que houve a degradação de compostos presentes no extrato que poderiam apresentar-se como fungitóxicos e/ou elicitores.

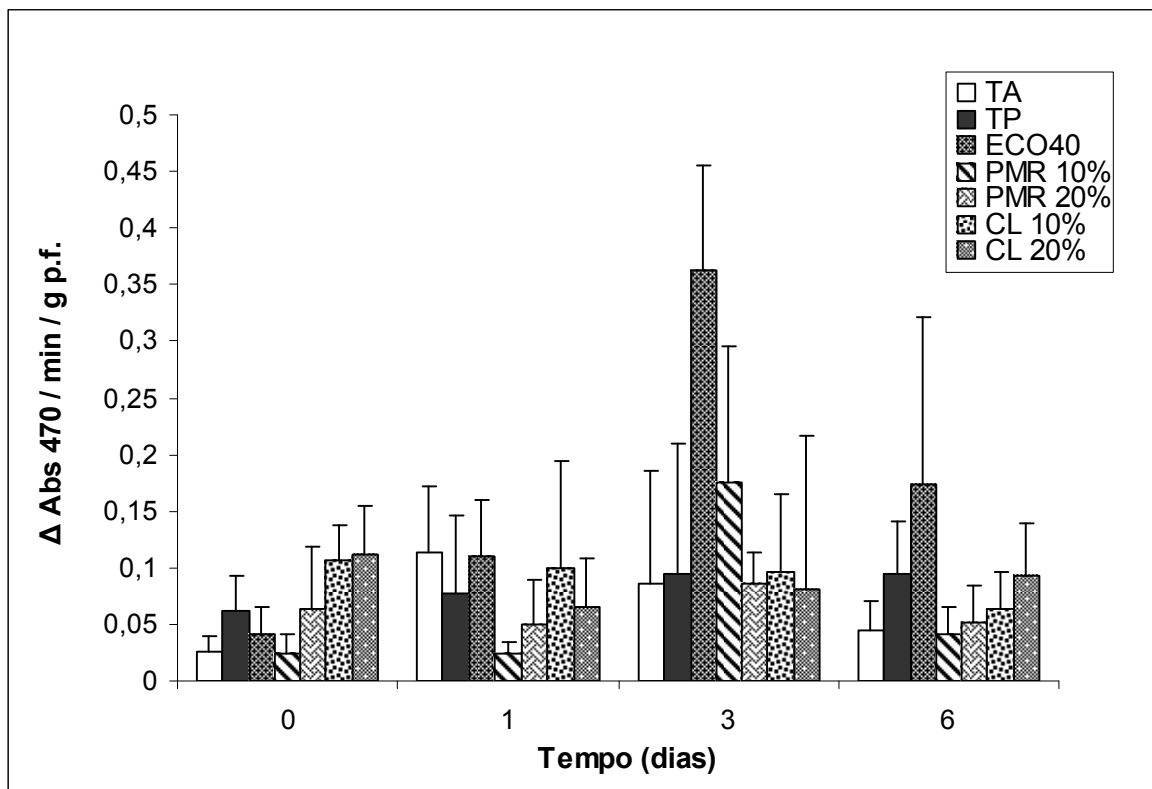
Outra hipótese seria de que os tratamentos deveriam ser feitos antecipadamente, em pré-colheita e antes do amadurecimento dos frutos, para que os mecanismos de defesa no hospedeiro pudessem ser ativados antes da entrada do patógeno, e impedissem o desenvolvimento da doença. Geralmente, a resistência a doenças é maior quando os frutos estão em estágio de amadurecimento menos avançado, tendo em vista que em frutos maduros os mecanismos de defesa ficam mais restritos, sejam eles bioquímicos ou estruturais (CAMILI et al., 2005). Neste caso, os mecanismos de defesa não foram ativados previamente ao aparecimento dos sintomas da doença e antes do



amadurecimento dos frutos, e então não conferiram resistência aos frutos, permitindo o desenvolvimento da doença. A(s) molécula(s) com ação fungitóxica ou elicitora pode apresentar constituição protéica ou à base de carboidratos, uma vez que os extratos de *C. citratus* e *C. martinii*, mesmo após a irradiação por microondas, apresentaram proteínas e carboidratos em sua constituição (Quadro 7A, Apêndices). A enzima peroxidase está também envolvida nos processos de deterioração oxidativa e amadurecimento dos frutos, além do fenômeno de indução de resistência, sendo assim, se faz necessário que outras enzimas envolvidas neste processo sejam avaliadas, como a  $\beta$ -1,3 glucanase e quitinase.



**Figura 4.** Atividade específica da peroxidase obtida de amostras de frutos de pimentão inoculados com suspensão de esporos de *Colletotrichum* sp. ( $1 \times 10^5$  esporos.mL<sup>-1</sup>) e após 2 dias tratados com extratos de *Cymbopogon martinii* e *Cymbopogon citratus*, e Extrato Cítrico. As amostras foram coletadas antes da inoculação e dos tratamentos, 1 dia após a inoculação, 3 dias após a inoculação e 1 dia dos tratamentos, e 6 dias após a inoculação e 4 dias dos tratamentos. TA: testemunha absoluta (não tratada e não inoculada); TP: testemunha positiva (não tratada e inoculada); ECO40: extrato cítrico na concentração de 20 ppm (2 mL de produto comercial/1000 mL de água destilada); PMR 10% e PMR 20%: extrato de *C. martinii* a 10% e 20%, respectivamente; CL 10% e CL 20%: extrato de *C. citratus* a 10% e 20%, respectivamente.



**Figura 5.** Atividade geral da peroxidase obtida de amostras de frutos de pimentão inoculados com suspensão de esporos de *Colletotrichum* sp. ( $1 \times 10^5$  esporos.mL<sup>-1</sup>) e após 2 dias tratados com extratos de *Cymbopogon martinii* e *Cymbopogon citratus*, e Extrato Cítrico. As amostras foram coletadas antes da inoculação e dos tratamentos, 1 dia após a inoculação, 3 dias após a inoculação e 1 dia dos tratamentos, e 6 dias após a inoculação e 4 dias dos tratamentos. TA: testemunha absoluta (não tratada e não inoculada); TP: testemunha positiva (não tratada e inoculada); ECO40: extrato cítrico na concentração de 20 ppm (2 mL de produto comercial/1000 mL de água destilada); PMR 10% e PMR 20%: extrato de *C. martinii* a 10% e 20%, respectivamente; CL 10% e CL 20%: extrato de *C. citratus* a 10% e 20%, respectivamente.

## 5. CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos, pôde-se concluir que:

- as duas espécies de *Cymbopogon* quando utilizadas na forma de extrato bruto aquoso não inibiram o crescimento micelial, esporulação e germinação de esporos de *Colletotrichum* sp., porém, inibiram a formação de apressórios;
- a espécie *Cymbopogon citratus* quando utilizada na forma de extrato bruto proporcionou maior inibição da formação de apressórios por *Colletotrichum* sp.;
- as duas espécies de *Cymbopogon* quando utilizadas na forma óleo essencial inibiram o crescimento micelial, esporulação, germinação de esporos e formação de apressórios por *Colletotrichum* sp.;
- *C. citratus* e *C. martinii* na forma de extrato bruto nas concentrações de 10 e 20% não controlaram a antracnose causada por *Colletotrichum* sp. e não ativaram a peroxidase em frutos de pimentão em pós-colheita.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMORIM, L. **Infecção**. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). Manual de fitopatologia: Princípios e conceitos. 3., São Paulo. Agronômica Ceres, v.1, p. 295-308, 1995.
- ANSARI, M. M. Control of sheat blight of rice by plant extracts. **Indian Phytopathology**, v. 49, p. 181-184, 1996.
- AULAKH, K. S.; GROVER, R. K. Ripe fruit rots in tomato and their control by oils. **Plant Disease Reporter**, v. 52, n. 7, p. 555-559, 1968.
- ANTHONY, S.; ABEYWICKRAMA, K. DAYANANDA, R.; SHANTHI, W.; ARAMBEWELA, L. Fungal pathogens associated with banana fruit in Sri Lanka, and their treatment with essential oils. **Mycopathologia**, v. 157, p. 91-97, 2004.
- BARROS, J. C. da S. M.; GOES, A. de; MINAMI, K. Condições de conservação pós-colheita de frutos de pimentão (*Capsicum annum* L.). **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 51, n. 2, p. 363-368, 1994.
- BASTOS, C. N.; ALBUQUERQUE, P. S. B. Efeito do óleo de *Piper aduncum* no controle pós-colheita de *Colletotrichum musae* em banana. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p. 555-557, 2004.
- BAUTISTA-BAÑOS, S.; HERNÁNDEZ-LÓPEZ, M.; BOSQUEZ-MOLINA, E.; WILSON, C. L. Effects of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose levels and quality of papaya fruit. **Crop Protection**, v. 22, p. 1087-1092, 2003.
- BENNET, R.; WALLSGROVE, R. M. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. **New Phytologist**, v. 127, p. 617-633, 1994.
- BETTIOL, W. (Ed.) **Controle Biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: Embrapa-CNPDA, 1991. 388 p. (Embrapa-CNPDA. Documentos, 15).
- BETTIOL, W. Biocontrole na filosfera: problemas e perspectivas. In: **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 5, p. 59-97, 1997.
- BONALDO, S.M.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; TESSMANN, D.J.; SCAPIM, C.A. Fungitoxidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de pepino contra *Colletotrichum lagenarium*, pelo extrato aquoso de *Eucalyptus citriodora*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 2, p. 128-134, 2004.

BONALDO, S. M.; PASCHOLATI, S. F.; ROMEIRO, R. S. **Indução de resistência: noções básicas e perspectivas**. In: CAVALCANTI, L. S.; DI PIERO, R. M.; CIA, P.; PASCHOATI, S. F.; RESENDE, M. L. V.; ROMEIRO, R. S. Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos, Piracicaba: Fealq, p. 11-27, 2005.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein- dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72: 248-254, 1976.

CAMILI, E. C.; CIA, P.; BENATO, E. A. **Indução de resistência contra doenças pós-colheita**. In: CAVALCANTI, L. S.; DI PIERO, R. M.; CIA, P.; PASCHOATI, S. F.; RESENDE, M. L. V.; ROMEIRO, R. S. Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos, Piracicaba: Fealq, p. 195-218, 2005.

CASALI, V. W. D.; COUTO, F. A. A. Origem e botânica de *Capsicum*. **Informe Agropecuário**, v. 10, n. 113, p. 8-10, 1984.

CASTRO, C. Aspectos moleculares e bioquímicos de interações planta-patógeno. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 7, p. 299-368, 1999.

CASTRO, L. O.; RAMOS, R. L. D. **Principais gramíneas produtoras de óleos essenciais**. Porto Alegre: Secretaria da Ciência e Tecnologia, 2002. 31 p. (Boletim FEPAGRO, 11).

CLEMENTE, E.; PASTORE, G. M. Peroxidase and polyphenoloxidase, the importance for food technology. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 32, n. 2, p. 167-171, 1998.

COOK, R.J.; BAKER, K.F. **The nature and practice of biological control of plant pathogens**. St. Paul: APS Press, 1983. 539p.

CONRATH, U.; THULKE, O.; KATZ, V.; SCHWINDLING, S.; KOHLER, A. Priming as a mechanism in induced systemic resistance of plants. **European Journal of Plant Pathology**, v. 107, p. 113-119, 2001.

CRUZ, M. E. S.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; PASCHOLATI, S. F. Efeito do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (capim limão) no crescimento micelial de fungos fitopatogênicos. In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 20, São Paulo, 1997. Resumos. **Summa Phytopathologica**, v. 23 (Suplemento),n. 1, p. 63, 1997.

CRUZ, M. E. S.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; FAGAN, C.; TAGAMI, O. K.; PASCHOLATI, S. F. Efeito do extrato bruto de *Cymbopogon*

*citratus* (capim limão) no crescimento micelial e germinação de esporos de fungos fitopatogênicos. In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 21, Botucatu, 1998. Resumos. **Summa Phytopathologica**, v. 24 (Suplemento), n. 1, p. 74, 1998.

DAAIF, F.; SCHMITT, A.; BÉLANGER, R. R. The effects of plant extracts of *Reynoutria sachalinensis* on powdery mildew development and leaf physiology of long English cucumber. **Plant Disease**, v. 79, p. 577-580, 1995.

DALISAY, R. F.; KUĆ, J. A. Persistence of induced resistance and enhanced peroxidase and chitinase activities in cucumber plants. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 47, p. 315-327, 1995.

DANTAS, S. A. F.; OLIVEIRA, S. M. A.; NETO, E. B.; COELHO, R. S. B.; SILVA, R. L. X.. Indutores de resistência na proteção do mamão contra podridões pós-colheita. **Summa Phytopathologica**, v. 30, n.3, p. 314-319. 2004.

DI PIERO, R. M.; PASCHOLATI, S. F. Efeito dos cogumelos *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* na interação entre plantas de tomate e *Xanthomonas vesicatoria*. **Summa Phytopathologica**, v. 30, p. 57-62, 2004.

DI STASI, L. C. **Química de produtos naturais: principais constituintes ativos**. In: DI STASI, L. C. (Ed.). Plantas Medicinais: Arte e Ciência - Um Guia de Estudos Multidisciplinar, São Paulo: Ed. Universidade Paulista, p. 109-127, 1996.

DIXIT, S. N.; CHANDRA, H.; TIWARI, R.; DIXIT, V. Development of a botanical fungicide against blue mould of mandarins. **Journal of Stored Products Research**, v. 31, p. 165-172, 1995.

DUBOIS, M.; HALMINTON, K.; REBERS, P.; SMITH, C. Colorimetric methods for determination of sugar and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 167, p. 350-356, 1956.

EL GHAOUTH, A.; ARUL, J.; WILSON, C.; BENHAMOU, N. Biochemical and cytochemical aspects of the interactions of chitosan and *Botrytis cinerea* in bell pepper fruit. **Postharvest Biological Technology**, v. 12, p. 183-194, 1997.

EMMETT, R. W.; PARBERY, D. G. Apressoria. **Annual Review of Phytopathology**, v. 13, p. 147-167, 1975.

FELIX, A. A. A.; MENDES, M. A. S.; SANTOS, M. F. ; PAULO, J. A. O. Fungos de expressão quarentenária para o Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, n. 28, p. 207, Supl., 2003.

FIORI, A.C.G.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F., STANGARLIN, J.R., VIDA, J.B., SCAPIM, C.A., CRUZ, M.E.S., PASCHOLATI, S.F. Antifungal activity of leaf extrats and essential oils of some medicinal plants against *Didymella bryoniae*. **Journal of Phytopathology**, v. 148, p. 483-487, 2000.

FILGUEIRA, F. A.R. **Novo Manual de Olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 2 ed. Viçosa: UFV, 2000. 402p.

FRANCO, D. A. S.; BETTIOL, W. Controle de *Penicillium digitatum* em pós-colheita de citros com produtos alternativos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 25, p. 602-606, 2000.

GUARDIA, A. M.; MORERA, T. A. G.; TERRERO, A. A. M.; HERNÁNDEZ, V. M.; CASTELLANOS, H. C.; RODRÍGUEZ, G. I. Obtención de um extracto plaguicida de *Gliricidia sepium* (Jaq.) Steud. Bajo la irradiación con microondas. **Revista Cubana de Plantas Medicinai**s, v. 8, n. 3, p. 1-5, 2003.

GOMES, A. M. A.; SILVEIRA, E. B.; MARIANO, R. L. R. Tratamento pós-colheita com cálcio e microrganismos para controle de podridão mole em tomate. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 1, p. 108-111, 2005.

GRIFFITHS, E. Iatrogenic plant diseases. **Annual Review Phytopathology**, v. 19, p. 69-82, 1981.

HALFELD-VIEIRA, B. A.; NECHET, K. L.; PEREIRA, P. R. V. S.; MOURÃO JUNIOR, M. Incidência da antracnose em frutos de cinco híbridos de pimentão em condições de cultivo protegido. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, Supl., p.33, 2004.

HAMMERSCHMIDT, T; NUCKLES, E. M., KUĆ, J. Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. **Physiological Plant Pathology**, London, v. 20, n.1, p. 73-82. 1982.

HAMMERSCHMIDT, R; DANN, E.K. **Induced resistance to disease**. In: RECHCIGL, N. A.; RECHCLGL, J. E. (Ed.) Environmentally safe approaches to crop disease control. Boca Ranton: CRC – Lewis Publishers, p. 177-199, 1997.

HANADA, R. E.; GASPAROTTO, L.; PEREIRA, J. C. R. Eficiência de desinfestantes na erradicação de conídios de *Mycosphaerella fijiensis* aderidos à superfície de bananas. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p. 94-96, 2004.

HENZ, G. P., BOITEUX, L. S.; LIMA, M. F. Reaction of *Capsicum* spp. fruits to *Colletotrichum gloeosporioides*. **Capsicum and Eggplant Newsletter**, v. 12, p. 79-80, 1993.



KUĆ, J. Concepts and direction of induced systemic resistance in plants and its application. **European Journal of Plant Pathology**, v. 107, p. 7-12, 2001.

KUROZAWA, C.; PAVAN, M. A. **Doenças das Solanáceas (berinjela, jiló, pimentão e pimenta)**. In: Kimati, H.; Amorim, L.; Bergamim Filho, A.; Camargo, L. E. A.; Rezende, J. A. M. Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas, 3. ed. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, v. 2, p. 665-675, 1997.

LOBO JUNIOR, M.; SILVA-LOBO, V. L.; LOPES, C. A. Reação de genótipos de *Capsicum* spp. (pimentas e pimentão) à antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*). **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, p. 373, Supl., 2001.

LUSSO, M. F. G.; PASCHOLATI, S. F. Activity and isoenzymatic pattern of soluble peroxidases in maize tissues after mechanical injury or fungal inoculation. **Summa Phytopathologica**, v. 25, p. 244-249, 1999.

MANANDHAR, J. B.; HARTMAN, G. L.; WANG, T. C. Anthracnose development on pepper fruits inoculated with *Colletotrichum gloeosporioides*. **Plant Disease**, v. 79, n. 4, p. 380-383, 1995a.

MANANDHAR, J. B.; HARTMAN, G. L.; WANG, T. C. Conidial germination and apressorial formation of *Colletotrichum capsici* and *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from pepper. **Plant Disease**, v. 79, n. 4, p. 361-366, 1995b.

MARTINS, E.R., CASTRO, D.M., CASTELLANI, D.C., DIAS, J. E. **Plantas medicinais**. Viçosa. UFV: p. 150-152, 2000.

MARI, M.; GUIZZARDI, M. The postharvest phase: emerging technologies for the control of fungal diseases. **Phytoparasitica**, v. 26, n. 1, p. 59-66, 1998.

MEDINA, P. V. L. Manejo pós-colheita de pimentões e pimentas. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 10, n.113, p. 72-76, 1984.

MONTALBINI, P. BUONAURO, R.; KUMAR, N. N. U. Peroxidase activity and isoperoxidase pattern in tobacco leaves infected with tobacco necrosis virus and other viruses inducing necrotic and non-necrotic alterations. **Journal of Phytopathology**, v. 143, p. 295-301, 1995.

MOTOYAMA, M.M.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; FIORI, A.C.G.; SCAPIM, C.A. Indução de fitoalexinas em soja e em sorgo e efeito fungitóxico de extratos cítricos sobre *Colletotrichum lagenarium* e *Fusarium semitectum*. **Acta Scientiarum Agronomy**, v.25, n.2, p. 491-496, 2003.

OBAGWU, J. KORSTEN, L. Control of citrus green and blue molds with garlic extrats. **European Journal of Plant Pathology**, v.109, p. 221-225, 2003.

OH, B. J.; KIM, K. D.; KIM, Y. S. Effect of cuticular wax layers of green and red pepper fruits on infection by *Colletotrichum gloeosporioides*. **Journal of Phytopathology**, v. 147, p. 547-552, 1999.

OLIVEIRA, F. de.; AKISSUE, G. **Fundamentos de Farmacobotânica**. São Paulo: Livraria Atheneu Editora, 1989, 221 p.

OLIVEIRA, S. M. A.; DANTAS, S. A. F.; GURGEL, L. M. S. Indução de resistência em doenças pós colheita em frutas e hortaliças. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 12, p. 343-371, 2004.

OLIVEIRA, R. F.; PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Papilla formation and peroxidase activity in *Mimosa scabrella* hypocotyls inoculated with the non-pathogen *Colletotrichum graminicola*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 22, n. 2, p.195-197, 1997.

OOSTENDORP, M.; KUNZ, W.; DIETRICH, B.; STAUB, T. Induced disease resistance in plants by chemicals. **European Journal of Plant Pathology**, v. 107, p. 19-28, 2001.

PALHANO, F. L.; VILCHES, T. T. B.; SANTOS, R. B.; ORLANDO, M. T. D.; VENTURA, J. A.; FERNANDES, P. M. B. Inactivation of *Colletotrichum gloeosporioides* spores by high hydrostatic pressure combined with citral or lemongrass essential oil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 95, p. 61-66, 2004.

PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. **Hospedeiro: Mecanismos de resistência**. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). Manual de fitopatologia: Princípios e conceitos, 3., São Paulo: Agronômica Ceres, v.1, p. 417-454, 1995.

PRASHAR, A.; HILI, P.; VENESS, R. G.; EVANS, C.S. Antimicrobial action of palmarosa oil (*Cymbopogon martinii*) on *Saccharomyces cerevisiae*. **Phytochemistry**, v. 63, p. 569-575. 2003.

QUINABRA, **Boletim Técnico Ecolife**, 2005. 11 p. Disponível em: [www.quinabra.com.br](http://www.quinabra.com.br) . Acesso em: 12/01/2006.

RANASINGUE, L.; JAYAWARDENA, B.; ABEYWICKRAMA, K. Fungicidal activity of essential oils of *Cinnamomum zeylanicum* (L.) and *Syzygium aromaticum* (L.) Merr et L. M. Perry against crown rot and anthracnose pathogens isolated from banana. **Letters in applied Microbiology**, v. 35, p. 208-211, 2002.

RAUBER, C. S.; PALMA, E. C.; LIMBERGER, R. P.; APEL, M.; HENRIQUES, A.; SCHA-POVAL, E. E. Avaliação da estabilidade do óleo volátil de *Cymbopogon citratus*. In: **Reunião da Sociedade latino – Americana de Fitoquímica**, 3., 1999; **Simpósio Latino – Americano de Farmacobotânica**, 9., 1999, Gramado. Porto Alegre: 1999.

RAWAL, R. D.; DESHPANDE, A. A.; SINGH, D. P.; PATHAK, C. S. Resistant, sources for anthracnose fruit rot (*Colletotrichum capsici*) in chilli peppers (*Capsicum* spp.). **Capsicum and Eggplant Newsletter**, v. 2, p. 126-127, 1989.

REGENTE, M.C., OLIVA, C.R., FFELDMAN, M.L., CASTAGNARO, A.P., CANAL, L. A sunflower leaf antifungal peptide active against *Sclerotinia sclerotiorum*. **Physiologia Plantarum**, v. 100, p. 178-182, 1997.

RIBEIRO, C. S. da C.; CRUZ, D. M. R. Comércio de sementes de pimentão está em expansão. Apenas o mercado nacional movimenta US\$ 1,5 milhão. **Revista Cultivar Hortalças e Frutas**, n. 21, set. 2003.

RÖDER, C. Controle alternativo de podridões causadas por fungos na pós-colheita em pêssego e morango. Marechal Cândido Rondon, 2003, 33 p. **Monografia (Graduação)**-Universidade do Oeste do Paraná-UNIOESTE.

ROSS, F.A. Systemic acquired resistance induced by localized virus infection in plants. **Virology**, v. 14, p. 340-358, 1961.

SANTOS, M. M. F. B. Efeito de extratos de *Lippia Alba* sobre o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.), isolados de *Citrus*. In: MING, L. C.; SCHEFFER, M. C.; CÔRREA JR., C.; BARROS, I. B. I. MATTOS, J. K. A. **Plantas Mediciniais, aromáticas e condimentares: avanços na pesquisa agrônômica**. Botucatu: UNESP, v. 2, p. 193-217, 1998.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. S.; BONALDO, S.; PASCHOLATI, S. F. Efeito do extrato bruto de *Eucalyptus citriodora* no crescimento micelial e germinação de esporos de fungos fitopatogênicos. In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 21, Botucatu, 1998. Resumos. **Summa Phytopathologica**, v. 24 (Suplemento), n. 1, p. 74, 1998.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. Potencial de extratos e óleos essenciais de vegetais como indutores de resistência-plantas medicinais. **Summa Phytopathologica**, v. 29 (Suplemento), n.1, p. 124-125. 2003.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R. **Extratos e óleos essenciais de plantas medicinais na indução de resistência**. In: CAVALCANTI, L. S.; DI PIERO, R. M.; CIA, P.; PASCHOATI, S. F.; RESENDE, M. L. V.; ROMEIRO, R. S. Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos, Piracicaba: Fealq, p. 125-132, 2005.

SHAHI, S. K.; PATRA, M.; SHUKLA, A. C.; DIKSHIT, A. Use of essential oil as botanical – pesticide against postharvest spoilage in *Malus pumilo* fruits. **BioControl**, v. 48, p. 223-232, 2003.

SIGRIST, J. M. M. **Perdas pós-colheita de frutas e hortalças**. In: CEREDA, M. P.; SANCHES, L. Manual de armazenamento e embalagem – produtos

agropecuários. Botucatu: Fundação de Estudos e Pesquisas Agrícolas e Florestais, p. 1-12, 1983.

SOBRINHO, C. A.; FERREIRA, P. T. O.; CAVALCANTI, L. S. **Indutores abióticos**. In: CAVALCANTI, L. S.; DI PIERO, R. M.; CIA, P.; PASCHOATI, S. F.; RESENDE, M. L. V.; ROMEIRO, R. S. Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos, Piracicaba: Fealq, p. 51-80, 2005.

SPOTS, R. A.; CERVANTES, L. A. Populations, pathogenicity and benomyl resistance of *Botrytis* spp., *Penicillium* spp. and *Mucor piriformis* in packing houses. **Plant Disease**, v. 70, p. 106-108, 1986.

STANGARLIN, J. R. Aspectos bioquímicos do fenômeno da indução de resistência. **Summa Phythopatologica**, v. 29 (Suplemento), n.1, p. 81-82, 2003.

THOMPSON, D. P. Effect of essential oils on spore germination of *Rhizopus*, *Mucor* and *Aspergillus* species. **Mycologia**, v. 78, n. 3, p. 482-485, 1986.

TOZZE JUNIOR, H. J.; BUENO, C. R.N.C.; MASSOLA JUNIOR, N. S. Caracterização morfológica e molecular de isolados de *Colletotrichum* sp. de hortaliças solanáceas. **Summa Phytopathologica**, v. 30, n. 1, p. 73, 2004.

TRIPATHI, P.; DUBEY, N. K.; BANERJI, R.; CHANSOURIA, J. P. N. Evaluation of some essential oils as botanical fungitoxicants in management of post-harvest rotting of Citrus fruits. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 1, p. 1-5, 2004.

VAN LOON, L. C. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. **European Journal of Plant Pathology**, v. 103 n. 9, p. 753-765, 1997.

VAN LOON, L. C. Sistemic acquired resistance, peroxidase activity and lesion size in tobacco reacting hypersensibility to Tobacco Mosaic Virus (TMV). **Physiology and Plant Pathology**, v. 8, p. 231-242, 1976.

ZAMBONELLI, A.; ZECHINI D'AURELIO, A.; BIANCHI, A.; ALBASIN, A. Effects of essential oils on phytopathogenic fungi in vitro. **Journal of Phytopathology**, v. 144, p. 491-494, 1996.

WILSON, CL.; EL GHAOUTH, A.; CHALUTZ, E.; DROBY, S.; STEVENS, C.; LU, J. Y.; KHAN, V.; ARUL, J. Potential of induced resistance to control postharvest diseases of fruits and vegetables. **Plant Disease**, v. 78, p. 837-844, 1994.

WILSON, C. L.; SOLAR, J. M.; EL GHAOUTH, A.; WISNIENSKI, M. E. Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. **Plant Disease**, v. 81, p. 204-210, 1997.

**Quadro 1A.** Análise de variância do crescimento micelial (cm) em extrato bruto aquoso

FV	GL	SQ	QM	F calculado
Espécie (E)	1	2251,90	2251,90	155,30*
Concentração (C)	6	266,69	44,45	3,07 <sup>ns</sup>
E x C	6	626	104,33	7,19*
Fatorial x Testemunha	1	38152,64	38152,64	2631,22*
Tratamentos	14	3268,62	233,47	
Resíduo	60	870,30	14,50	
TOTAL	74	4138,92		
C.V. (%): 5,78				
Média Geral: 6,589 cm				

<sup>ns</sup> não significativo pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade

\* significativo pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade

**Quadro 2A.** Análise de variância da esporulação (números de esporos.cm<sup>-2</sup>) em extrato bruto aquoso

FV	GL	SQ	QM	F calculado
Espécie (E)	1	626,99	626,99	0,99 <sup>ns</sup>
Concentração (C)	6	56986,58	9497,76	15,07*
E x C	6	13845,03	2307,50	3,66*
Fatorial x Testemunha	1	612873,85	612873,85	972,85*
Tratamentos	14	74177,89	5298,42	
Resíduo	60	37798,62	629,98	
TOTAL	74	11976,51		
C.V. (%): 19,11				
Média Geral: 131,36 esporos/cm <sup>2</sup>				

<sup>ns</sup> não significativo pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade

\* significativo pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade

**Quadro 3A.** Análise de variância da germinação de esporos (%) em extrato bruto aquoso

FV	GL	SQ	QM	F calculado
Espécie (E)	1	1223,07	1263,07	199,20*
Concentração (C)	6	3998,65	666,44	108,54*
E x C	6	1294,34	215,72	35,13*
Fatorial x Testemunha	1	201098,21	201098,21	32752,15*
Tratamentos	14	25288,48	1806,32	
Resíduo	60	368,66	6,14	
TOTAL	74	25657,14		
C.V. (%): 2,82				
Média Geral: 87,96%				

<sup>ns</sup> não significativo pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade

\* significativo pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade

**Quadro 4A.** Análise de variância da formação de apressórios (%) em extrato bruto aquoso

FV	GL	SQ	QM	F calculado
Espécie (E)	1	1141,70	1141,70	32,09*
Concentração (C)	6	21687,35	3614,56	101,59*
E x C	6	574,64	95,77	2,69*
Fatorial x Testemunha	1	228568,86	228568,86	6428,08*
Tratamentos	14	25948,75	1853,48	
Resíduo	60	2134,72	35,58	
TOTAL	74	28083,47		
C.V. (%): 25,05				
Média Geral: 23,81%				

<sup>ns</sup> não significativo pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade

\* significativo pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade

**Quadro 5A.** Análise de variância da redução de peso de frutos (%)

FV	GL	SQ	QM	F calculado
Espécie (E)	1	43,07	43,07	4,75*
Concentrações (C)	1	0,33	0,33	0,04 <sup>ns</sup>
E x C	1	37,89	37,89	4,18 <sup>ns</sup>
Testemunhas	2	30,39	15,20	1,67 <sup>ns</sup>
Fatorial x Testemunhas	1	346,63	346,63	38,26*
Tratamentos	6	81,45	13,57	
Resíduo	28	253,67	9,06	
Total	34	335,11		

Média Geral: 11,20  
CV (%): 26,88%

<sup>ns</sup> não significativo pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade

\* significativo pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade

**Quadro 6A.** Análise de variância da AACPD após 6 dias dos tratamentos

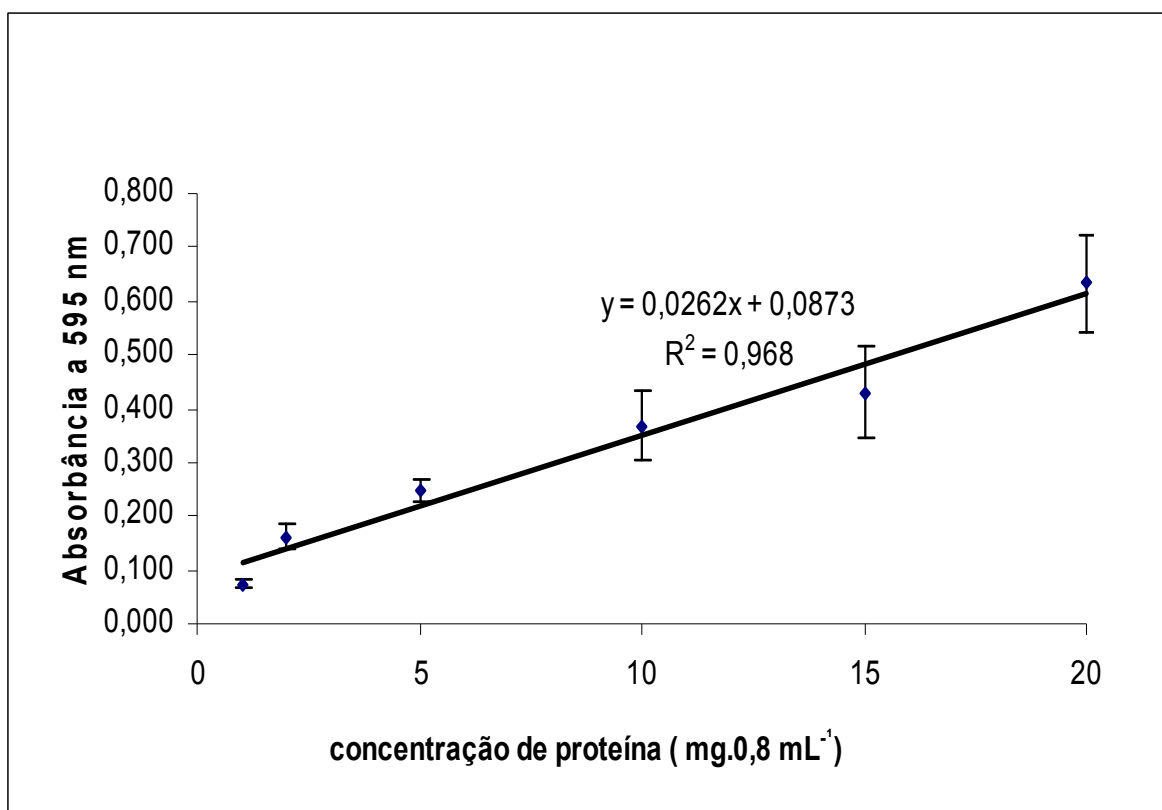
FV	GL	SQ	QM	F calculado
Tratamentos	5	3,93	0,79	1,539 <sup>ns</sup>
Resíduo	24	12,26	0,51	
Total	29	16,19		

Média Geral: 3,10  
CV (%): 23,02

Dados transformados para efeito de estatística por  $(x + 1)^{0,5}$

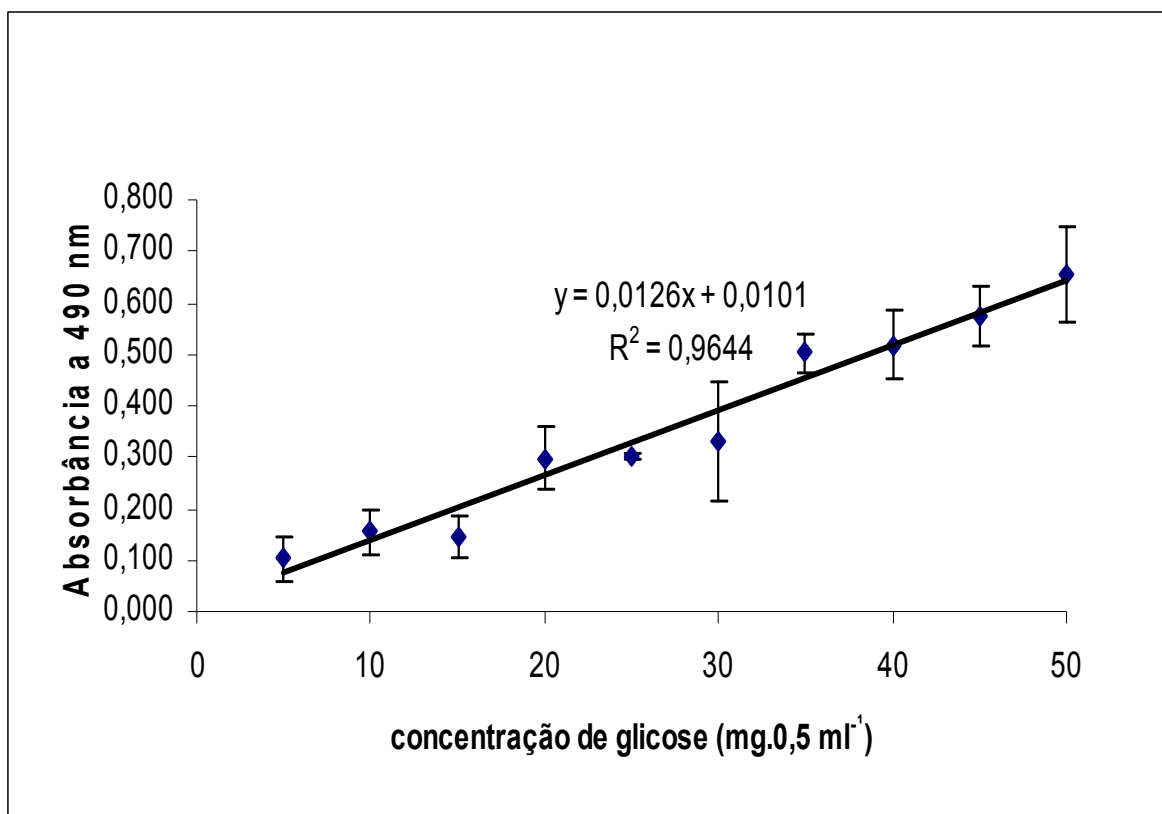
<sup>ns</sup> não significativo pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade

\* significativo pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade



**Figura 1A.** Curva padrão para a dosagem de proteínas totais através do Método de Bradford (BRADFORD, 1976).





**Figura 2A.** Curva padrão para a dosagem de carboidratos totais através do método do Fenol Sulfúrico (DUBOIS et al., 1956).

**Quadro 7A.** Teor de proteínas e carboidratos presentes nos extratos brutos aquosos de *Cymbopogon citratus* e *C. martinii*

Concentrações dos extratos (%)	Teor de proteína ( $\mu\text{g}$ proteína.mL <sup>-1</sup> )	
	<i>Cymbopogon citratus</i>	<i>Cymbopogon martinii</i>
10	0,238	0,245
20	0,242	0,248

Concentrações dos extratos (%)	Teor de carboidratos ( $\mu\text{g}$ açúcar.mL <sup>-1</sup> )	
	<i>Cymbopogon citratus</i>	<i>Cymbopogon martinii</i>
10	2,532	2,297
20	2,909	2,719

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)