

Marques, K.M., Muniz, A.C.C., Silva, J.P., Galati, V.C., Inestroza-Carlos, C., Mattiuz, B.H. 2015. Avaliação de óleos essenciais no controle da antracnose em pós-colheita de abacate 'Hass'. In: **Congresso Brasileiro de Processamento mínimo e Pós-colheita de frutas, flores e hortaliças**, 001. Anais... Aracaju-SE.

1 **Avaliação de óleos essenciais no controle da antracnose em pós-colheita**
2 **de abacate 'Hass'. Kelly M. Marques¹, Ana C. C. Muniz¹, Josiane P. Silva¹,**
3 **Vanessa C. Galati¹, C. Inestroza-Lizardo¹, Ben-Hur Mattiuz¹**

4 ¹Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP - Univ Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal,
5 São Paulo, Brasil. kelly_mgmq@hotmail.com, carolmunizagro@gmail.com, josi19pereira@hotmail.com,
6 vanessagalati@bol.com.br, cinestrozalizardo@gmail.com; benhur@fcav.unesp.br

7

8 **RESUMO**

9 O objetivo do presente trabalho foi avaliar os óleos essenciais extraídos das espécies
10 *Thymus vulgaris* e *Lippia sidoides* no controle da antracnose em pós-colheita de abacate
11 'Hass'. Na etapa *in vitro*, os óleos foram adicionados ao meio de cultura, em seis
12 repetições por tratamento. No teste *in vivo*, os frutos foram inoculados com suspensão
13 conidial de *Colletotrichum gloeosporioides* e em seguida armazenados por 10h a 22 °C.
14 Os abacates inoculados foram imersos por 1 minuto em cada óleo essencial associado à
15 cera comercial, nas doses de 200; 500 e 1000 µL.L⁻¹. Após, os frutos foram
16 armazenados a 12±2 °C e 80±3% UR por 14 dias. Depois de 14 dias, de cada
17 tratamento, um conjunto de frutos foi avaliado e outro transferido para temperatura de
18 22±2 °C e 80± 5% UR por 3 dias. Avaliou-se, *in vitro*, o crescimento micelial, e, *in vivo*,
19 a severidade e a incidência da doença, a taxa respiratória e a produção de etileno. Os
20 óleos testados nas concentrações a partir de 200 µL.L⁻¹ inibiu o crescimento micelial de
21 *C. gloeosporioides in vitro*. As concentrações de 500 e 1000 µL.L⁻¹ apresentaram
22 melhores resultados quanto a redução da severidade da doença, da taxa respiratória e
23 produção de etileno, indicando que estes óleos apresentam potencial para o controle da
24 antracnose na pós-colheita de abacates 'Hass'.

25 **PALAVRAS-CHAVE:** *Thymus vulgaris*, *Lippia sidoides*, *Colletotrichum*
26 *gloeosporioides*, *Persea americana*.

27

28 **ABSTRACT**

29 **Evaluation of essential oils for the control of postharvest anthracnose**
30 **in 'Hass' avocado.**

31 The aim of this work was to evaluate the essential oils extracted from the plants *Thymus*
32 *vulgaris* e *Lippia sidoides* for the control of anthracnose in postharvest of 'Hass'

Marques, K.M., Muniz, A.C.C., Silva, J.P., Galati, V.C., Inestroza-Carlos, C., Mattiuz, B.H. 2015. Avaliação de óleos essenciais no controle da antracnose em pós-colheita de abacate 'Hass'. In: **Congresso Brasileiro de Processamento mínimo e Pós-colheita de frutas, flores e hortaliças**, 001. Anais... Aracaju-SE.

33 avocado fruit. In *in vitro* step the oils were added to the culture medium, in 6
34 replications per treatment. In *in vivo* step, the fruits were inoculated with conidial
35 suspension of *C. gloeosporioides*, and they were stored for 10h at 22 °C. The infected
36 avocados were immersed for 1 minute in each oil associated with a commercial wax, at
37 doses of 200; 500 e 1000 $\mu\text{L.L}^{-1}$. After, the fruits were stored at 12 ± 2 °C and $80\pm 3\%$
38 relative humidity (RH) for 14 days. After 14 days, of each treatment, a number of fruit
39 was evaluated and other fruits were transferred to temperature at 22 ± 2 °C and $80\pm 5\%$
40 (RH) for 3 days. It was evaluated *in vitro*, the mycelial growth, and *in vivo*, the severity
41 of disease and the incidence of the disease, the respiratory rate and the ethylene
42 production. The oils tested at concentrations from 200 $\mu\text{L.L}^{-1}$ inhibited the mycelial
43 growth of *C. gloeosporioides* in vitro. The concentrations of 500 and 1000 $\mu\text{L.L}^{-1}$
44 showed better results for the reduction of disease severity, the respiratory rate and the
45 ethylene production, indicating that these oils have potential for control the anthracnose
46 in postharvest of avocados 'Hass'.

47 **Keywords:** *Thymus vulgaris*, *Lippia sidoides*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Persea*
48 *americana*.

49

50 **INTRODUÇÃO**

51 Dentre as doenças que ocorrem no abacate (*Persea americana* Mill., família Lauraceae)
52 destaca-se a antracnose causada por *Colletotrichum gloeosporioides*, considerada uma
53 das mais importantes doenças de frutos tropicais (Phoulivong et al., 2010). O uso de
54 produtos naturais, como os óleos essenciais (OE), tem se mostrado uma alternativa
55 eficiente no controle de doenças fúngicas por apresentarem efeito antimicrobiano e por
56 serem considerados alternativa natural aos fungicidas sintéticos (Sivakumar e Bautista-
57 Baños, 2014).

58

59 **MATERIAL E MÉTODOS**

60 Abacates 'Hass' provenientes de produtores comerciais da região de Bauru-SP
61 ($22^{\circ}18'53''\text{S}$ e $49^{\circ}03'38''\text{W}$) foram selecionados no estágio de maturação fisiológico
62 (Daiuto, 2012). Em seguida, transportados ao Laboratório de Pós-Colheita da UNESP,
63 Câmpus de Jaboticabal, lavados com detergente neutro, enxaguados em água corrente e
64 higienizados em solução de Sumaveg® a 200 mg L^{-1} de cloro livre, por 5 min. O fungo

Marques, K.M., Muniz, A.C.C., Silva, J.P., Galati, V.C., Inestroza-Carlos, C., Mattiuz, B.H. 2015. Avaliação de óleos essenciais no controle da antracnose em pós-colheita de abacate 'Hass'. In: **Congresso Brasileiro de Processamento mínimo e Pós-colheita de frutas, flores e hortaliças**, 001. Anais... Aracaju-SE.

65 *C. gloeosporioides* foi isolado de abacates naturalmente infectados, e mantidos à
66 temperatura de 25-28 °C. Foram testados *in vitro* os óleos essenciais extraídos de
67 *Thymus vulgaris* (família Lamiaceae) e *Lippia sidoides* (família Verbenaceae) os quais
68 foram dissolvidos em Tween 80 a 0,01% e, em seguida, incorporado em meio de cultura
69 (BDA) fundente 45-50°C, nas diferentes concentrações (Xing et al., 2011). O
70 experimento foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado,
71 composto por sete doses do óleo de *T. vulgaris* (0; 10; 50; 100; 200; 500 e 1000 µL L⁻¹)
72 e seis doses do óleo de *L. sidoides* (0; 100; 200; 400; 500 e 1000 µL L⁻¹) com 6
73 repetições. Nos testes *in vivo*, cada fruto foi inoculado em dois pontos opostos com 25
74 µL da suspensão conidial de *C. gloeosporioides* (2.10⁵ con mL⁻¹), utilizando-se uma
75 seringa de cromatografia. Em seguida foram armazenados por 10h a 22 °C, para
76 estabelecimento do fungo. Em seguida, os abacates foram imersos, por 1 minuto, em
77 solução de cera comercial (Aruá® BR-A2 Tropical) associada a três concentrações (200
78 µL.L⁻¹, 500 µL.L⁻¹ e 1000 µL.L⁻¹) de cada OE. Os frutos testemunha foram imersos em
79 água destilada e em cera. Após a secagem e formação do recobrimento, os frutos foram
80 armazenados a 12±2 °C e 80±5% UR. Após 14 dias, de cada tratamento, um conjunto de
81 frutos foi avaliado e outro transferido para temperatura de 22±2 °C e 80± 5% aonde
82 permaneceram por 3 dias. O experimento foi conduzido em delineamento experimental
83 inteiramente casualizado, em esquema fatorial composto por cinco tratamentos (cera +
84 cera/3 concentrações do óleo + testemunha) e três datas de avaliação (9, 14 e 17 dias).
85 Foram utilizadas 4 repetições com 5 frutos cada. Avaliou-se *in vivo*: a severidade da
86 doença medida em dois sentidos no fruto; a incidência da doença foi determinada de
87 acordo com Xing et al. (2010) usando a equação: Incidência da doença (%)= (Número
88 de ferimentos infectados/Total de frutos inoculados) × 100; a taxa respiratória e
89 produção de etileno dos frutos foi obtida pela coleta da atmosfera gasosa do interior de
90 recipientes herméticos onde os frutos eram mantidos por 1 hora, as amostras foram
91 analisadas em cromatógrafo a gás, modelo Trace GC Ultra da Thermo Scientific, no
92 qual o gás de arraste foi o hidrogênio, a um fluxo de 30 mL/minuto, e as temperaturas
93 mantidas no aparelho foram de 110°C para a coluna, 200 °C no injetor, 250 °C no
94 detector e 350° C no metanador; a perda de massa fresca dos produtos foi quantificada
95 em balança com precisão de 0,01g. Os resultados foram submetidos à análise de
96 variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

97

98 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

99 A dose mínima inibitória do fungo foi de $200 \mu\text{L L}^{-1}$ tanto para o óleo de *T. vulgaris*
100 como para o óleo de *L. sidoides* sendo que a partir desta dose a inibição do crescimento
101 micelial do patógeno foi de 100% (Figuras 1A e 1B). Estes resultados comprovam o
102 efeito fungicida destes óleos sobre o patógeno. Os experimentos *in vitro* são muito
103 importantes por permitir a identificação de óleos essenciais, e suas concentrações, que
104 são eficazes na inibição de uma espécie ou de um grupo de microrganismos patogênicos
105 (Combrinck et al., 2011). Para os experimentos *in vivo* com o óleo *T. vulgaris* observa-
106 se que a manifestação da doença ocorreu aos 9 dias de armazenamento refrigerado,
107 sendo que os sintomas só se manifestaram nos frutos dos controles com água e com
108 cera, e naqueles frutos do tratamento a $200 \mu\text{L L}^{-1}$ de óleo associado a cera (Figura 2A).
109 Aos 14 dias de armazenamento, a severidade da doença foi menor nos frutos recobertos
110 com cera e $500 \mu\text{L L}^{-1}$ ou $1000 \mu\text{L L}^{-1}$ de óleo, indicando a superioridade destes
111 tratamentos. Ao final do período de armazenamento (17 dias) a severidade da doença foi
112 maior em todos os tratamentos, consequência do desenvolvimento do patógeno em
113 temperaturas mais elevadas (3 dias a $22 \text{ }^\circ\text{C}$). No entanto, houve destaque para os
114 tratamentos com $500 \mu\text{L L}^{-1}$ e $1000 \mu\text{L L}^{-1}$ de óleo de *T. vulgaris*, os quais
115 proporcionaram menor severidade da doença nos frutos tratados nestas doses. Em
116 relação à incidência da doença, os frutos do controle, imersos em água, apresentaram
117 maior incidência da antracnose, e em relação aos tratamentos analisados, não houve
118 diferença entre eles (Figura 2B). Em relação aos experimentos com o óleo *L. sidoides*,
119 ocorreu a manifestação da doença nos frutos aos 9 dias de armazenamento sob
120 refrigeração. Houve diferenças dos tratamentos em relação ao controle (água) na
121 redução da severidade da doença, porém não houve diferenças entre os tratamentos
122 (Figura 2C). No entanto, aos 14 dias de armazenamento a $12 \text{ }^\circ\text{C}$ os frutos dos
123 tratamentos com $500 \mu\text{L L}^{-1}$ e $1000 \mu\text{L L}^{-1}$ de óleo apresentaram menor severidade da
124 doença. Após os frutos serem transferidos para a condição ambiente, $22 \text{ }^\circ\text{C}$, todas as
125 concentrações testadas deste óleo reduziram a severidade da antracnose nos frutos
126 inoculados, quando comparados aos controles com água e cera. Com relação à
127 incidência da doença, nota-se melhor resultado para o tratamento com $500 \mu\text{L L}^{-1}$ de
128 óleo de *L. sidoides* em cera, que se destacou dos demais, por proporcionar menor

Marques, K.M., Muniz, A.C.C., Silva, J.P., Galati, V.C., Inestroza-Carlos, C., Mattiuz, B.H. 2015. Avaliação de óleos essenciais no controle da antracnose em pós-colheita de abacate 'Hass'. In: **Congresso Brasileiro de Processamento mínimo e Pós-colheita de frutas, flores e hortaliças**, 001. Anais... Aracaju-SE.

129 incidência da severidade da antracnose nos frutos armazenados aos 14 e 17 dias (Figura
130 2D). Para os testes com o óleo de *T. vulgaris*, nota-se que a taxa respiratória inicial dos
131 frutos reduziu até o 9º dia de armazenamento, aumentando até o final do período (Figura
132 3A). Após o 9º dia houve incremento da atividade respiratória em consequência do
133 amadurecimento dos abacates. Nota-se uma redução na taxa respiratória dos frutos
134 tratados com 500 $\mu\text{L L}^{-1}$ e 1000 $\mu\text{L L}^{-1}$ de óleo ao final do armazenamento. Ao longo do
135 período de armazenamento, a produção de etileno pelos frutos reduziu
136 proporcionalmente à concentração de óleo aplicada, com destaque para as doses de 500
137 $\mu\text{L L}^{-1}$ e 1000 $\mu\text{L L}^{-1}$ do óleo diferindo significativamente dos controles (Figura 3B). A
138 menor produção de etileno na associação da cera com o óleo de *T. vulgaris* nas maiores
139 concentrações também ocasionou redução da severidade da doença (Figura 2A). Para a
140 taxa respiratória dos frutos, no teste com *L. sidoides*, observa-se uma tendência de
141 diminuição até o 9º dia de armazenamento, como consequência do armazenamento
142 refrigerado, seguido de aumento até o final do período como resposta dos frutos ao
143 amadurecimento (Figura 3C). A partir do 14º dia de armazenamento todos os
144 tratamentos reduziram a respiração dos abacates em comparação ao controle com água,
145 sendo que ao final do armazenamento, os tratamentos com o óleo essencial obtiveram
146 frutos com menor taxa respiratória. A produção de etileno pelos frutos foi maior
147 naqueles do controle, imersos somente em água, até os 14 dias de armazenamento
148 (Figura 3D). Este resultado mostra o efeito da cera utilizada em vegetais como
149 revestimento, com a finalidade de regular as trocas gasosas, diminuindo assim a
150 atividade respiratória, a biossíntese e ação do etileno, e desse modo atrasar o
151 amadurecimento dos frutos (Chitarra e Chitarra, 2005). Ao final do armazenamento, não
152 houve diferença entre os tratamentos em relação ao etileno produzido pelos frutos. A
153 aplicação de óleos essenciais associados a revestimento naturais tem apresentado
154 resultados promissores não somente para o controle de microrganismos patogênicos,
155 mas também na manutenção da qualidade de frutos (Sánchez-González et al., 2011).

156

157 **CONCLUSÕES**

158 Os óleos de *T. vulgaris* e *L. sidoides*, nas concentrações a partir de 200 $\mu\text{L L}^{-1}$, inibiram
159 o crescimento micelial de *C. gloeosporioides in vitro*, enquanto que as concentrações de
160 500 $\mu\text{L L}^{-1}$ e 1000 $\mu\text{L L}^{-1}$ dos óleos associados à cera foram mais efetivas na redução da

Marques, K.M., Muniz, A.C.C., Silva, J.P., Galati, V.C., Inestroza-Carlos, C., Mattiuz, B.H. 2015. Avaliação de óleos essenciais no controle da antracnose em pós-colheita de abacate 'Hass'. In: **Congresso Brasileiro de Processamento mínimo e Pós-colheita de frutas, flores e hortaliças**, 001. Anais... Aracaju-SE.

161 severidade e incidência da doença, e redução da taxa respiratória e produção de etileno
162 de abacates 'Hass'.

163

164 **AGRADECIMENTOS**

165 À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de
166 estudos da primeira autora (Processo nº 2013/09268-6). Às empresas Jaguacy pelo
167 fornecimento dos frutos, e Aruá pelo fornecimento da cera.

168

169 **REFERÊNCIAS**

170 CHITARRA, M.I.F; CHITARRA, A.B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia**
171 **e manuseio**. Lavras. UFLA, 2005. 785 p.

172 COMBRINCK, S.; REGNIER, T.; KAMATOU, G.P.P. *In vitro* activity of eighteen
173 essential oils and some major components against common postharvest fungal
174 pathogens of fruit. **Industrial Crops and Products**, v. 33, p. 344-349, 2011.

175 DAIUTO, E.R.; MINARELLI, P.H.; VIEITES, R.L.; ORSI, R. de O. Própolis e cera
176 vegetal na conservação de abacate 'Hass'. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 4, p.
177 1463-1474, 2012.

178 PHOULIVONG, S.; CAI, L.; CHEN, H.; MCKENZIE E. H. C.; ABDELSALAM, K.;
179 CHUKEATIROTE, E.; HYDE, K. D. *Colletotrichum gloeosporioides* is not a common
180 pathogen on tropical fruits. **Fungal Diversity**, Indonesia, v. 44, n.1, p. 33-43, 2010.

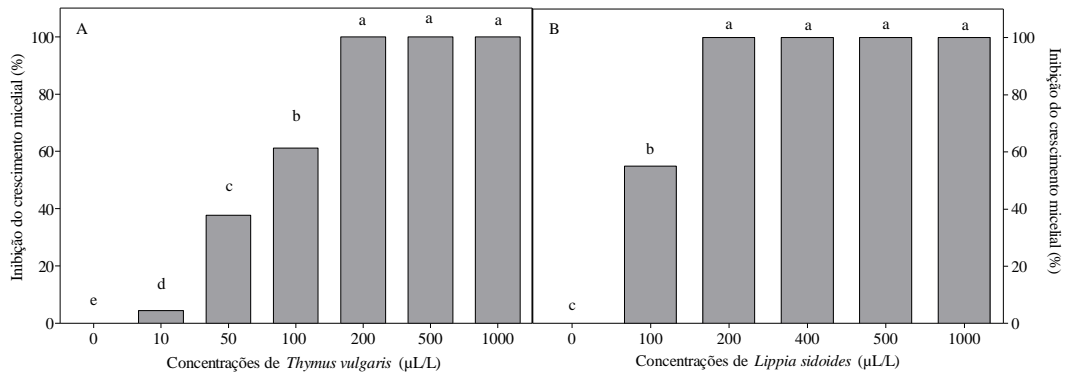
181 SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, L.; VARGAS, M.; GONZALEZ-MARTÍNEZ, C.;
182 CHIRALT, A.; CHAFER, M. Use of essential oils in bioactive edible coatings. **Food**
183 **Engineering Reviews**, v. 3, p. 1-16, 2011.

184 SIVAKUMAR, D.; BAUTISTA-BAÑOS, S. A review on the use of essential oils for
185 postharvest decay control and maintenance of fruit quality during storage. **Crop**
186 **Protection**, v. 64, p. 27 – 37, 2014.

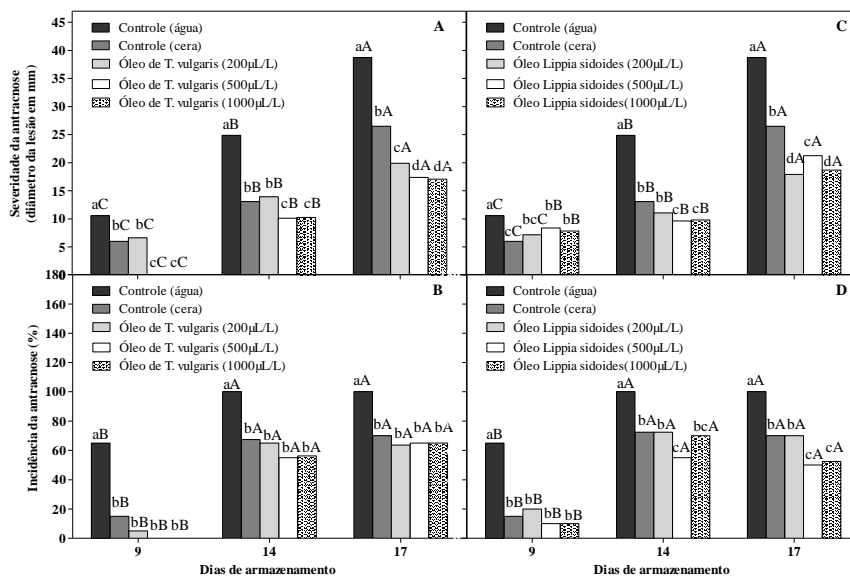
187 XING, Y.; LI, X.; XU, Q.; YUN, J.; LU, Y. Antifungal activities of cinnamon oil
188 against *Rhizopus nigricans*, *Aspergillus flavus* and *Penicillium expansum* *in vitro* and *in*
189 *vivo* fruit test. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 45, p.1837–
190 1842, 2010.

191 XING, Y.; LI X.; XU, Q.; YUN, J.; LU, Y.; TANG, Y. Effects of chitosan coating
192 enriched with cinnamon oil on qualitative properties of sweet pepper (*Capsicum*
193 *annuum* L.). **Food Chemistry**, v. 124, p. 1443–1450, 2011.

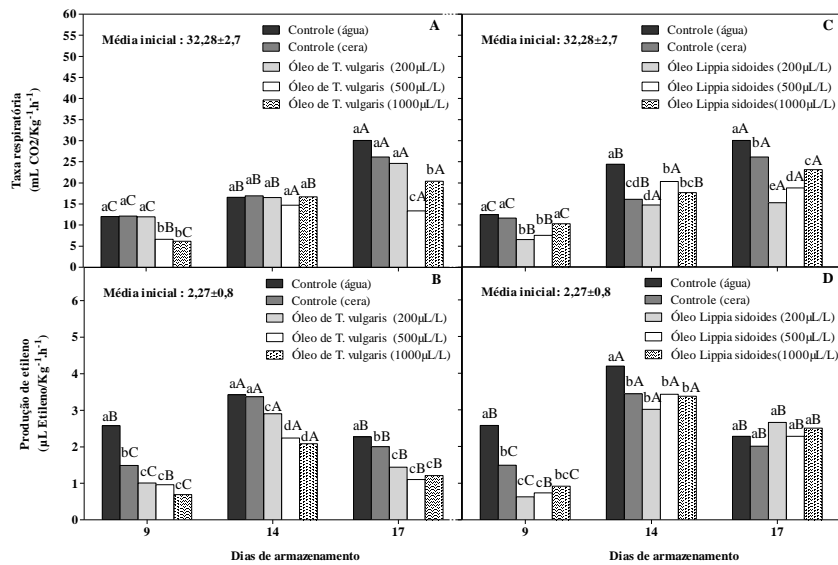
194



195 **Figura 1:** Efeito inibitório dos óleos de *T. vulgari* (A) e *L. sidoides* (B) no crescimento
 196 micelial de *C. gloeosporioides* a 27 °C incubado por 7 dias. Letras minúsculas iguais
 197 não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). (n=6). (Inhibitory effect of oils of
 198 *T. vulgari* (A) and *L. sidoides* (B) on mycelial growth of *C. gloeosporioides* at 27°C
 199 incubation for 7 days. The same lowercase letters do not differ by Tukey test ($P < 0,05$).
 200 (n=6).
 201



202 **Figura 2:** Efeito dos óleos de *T. vulgari* (A e B) e *L. sidoides* (C e D) na severidade e
 203 na incidência da antracnose em abacates inoculados, armazenados por 14 dias a 12±2 °C
 204 e 80±3% UR + 3 dias a 22±2 °C e 80±3% UR. Letras minúsculas iguais dentro do grupo
 205 e maiúsculas entre os grupos de colunas não diferem entre si, pelo teste de Tukey
 206 ($P < 0,05$). (n=4). (Effect of oils of *T. vulgari* (A and B) and *L. sidoides* (C and D) on
 207 severity and incidence of anthracnose of inoculated avocados, stored for 14 days at
 208 12±2 °C and 80±3% RH, and + 3 days at 22±2 °C and 80±3% RH. The same lowercase
 209 letters do not differ by Tukey test ($P < 0,05$). (n=4)).
 210



211 **Figura 3:** Efeito dos óleos de *T. vulgaris* (A e B) e *L. sidoides* (C e D) na taxa
 212 respiratória e na produção de etileno de abacates inoculados, armazenados por 14 dias a
 213 12±2 °C e 80±3% UR + 3 dias a 22±2 °C e 80±3% UR. Letras minúsculas iguais dentro
 214 do grupo e maiúsculas entre os grupos de colunas não diferem entre si, pelo teste de
 215 Tukey ($P < 0,05$). (n=4). (Effect of oils of *T. vulgaris* (A and B) and *L. sidoides* (C and
 216 D) on respiration rate and ethylene production of inoculated avocados, stored for 14
 217 days at 12±2 °C and 80±3% RH, and + 3 days at 22±2 °C and 80±3% RH. The same
 218 lowercase letters do not differ by Tukey test ($P < 0,05$). (n=4)).
 219