



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

LÍDIA PINHEIRO DA NÓBREGA

**POTENCIAL FUNGITÓXICO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE COPAIBA E
EUCALIPTO SOBRE FITOPATÓGENOS**

POMBAL – PB
2018

LÍDIA PINHEIRO DA NÓBREGA

**POTENCIAL FUNGITÓXICO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE COPAIBA E
EUCALIPTO SOBRE FITOPATÓGENOS**

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

Orientador: Prof. D.Sc. Antônio Francisco de Mendonça Júnior

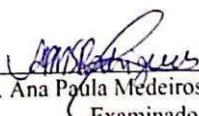
CAMPUS DE POMBAL
**POTENCIAL FUNGITÓXICO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE COPAÍBA E EUCALIPTO
SOBRE FITOPATÓGENOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Sistemas Agroindustriais do Centro de Ciências e Tecnologia Agroalimentar da Universidade Federal de Campina Grande, Campus Pombal-PB, em cumprimento às exigências para obtenção do Título de Mestre (M.Sc.) em Sistemas Agroindustriais.

COMISSÃO EXAMINADORA


Prof. D.Sc. Antônio Francisco de Mendonça Júnior
Orientador


Prof. D.Sc. Tiago Augusto Lima Cardoso
Examinador


Prof.ª D.Sc. Ana Paula Medeiros dos Santos Rodrigues
Examinadora


Prof. D.Sc. Patrício Borges Maracá
Examinador

Pombal - PB, 10 de dezembro de 2018

N754p

Nóbrega, Lídia Pinheiro da.

Potencial fungitóxico dos óleos essenciais de copaíba e eucalipto sobre fitopatógenos / Lídia Pinheiro da Nóbrega. – Pombal, 2019.
36 f. : il. color.

Dissertação (Mestrado em Sistemas Agroindustriais) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia Agroalimentar, 2018.

"Orientação: Prof. Dr. Antônio Francisco de Mendonça Júnior".
Referências.

1. Antifúngico. 2. Óleos essenciais. 3. Copaifera sp. 4. Eucalyptus sp.
5. Fungitoxidade. 6. Crescimento micelial I. Mendonça Júnior, Antônio Francisco de. II. Título.

CDU 632.952(043)

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, pois sem ele eu não teria forças para essa longa jornada.

A meu esposo Francisco Torres de Moraes Filho, a minha filha Isadora Nóbrega Torres e ao meu bebê Isaac Henrique da Nóbrega Torres (37 semanas de gestação), obrigada pelo carinho, a paciência e pela capacidade de me trazerem paz na correria de cada semestre.

Aos meus pais José Luciano Pinheiro da Nóbrega e Maria Solange Pinheiro da Nóbrega e toda minha família que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me permitiu chegar até aqui, dando-me saúde e força para superar as dificuldades.

Ao meu orientador, o professor Antônio Francisco de Mendonça Junior, pela oportunidade e apoio na elaboração deste trabalho.

Ao Professor Patrício Borges Maracajá, por sua compreensão quando muitas vezes estive impossibilitada em minhas atividades acadêmicas e pensei em desistir, suas palavras de apoio e seu jeito acolhedor me faziam repensar e continuar, serei eternamente grata.

Ao colega e amigo Kevison Romulo da Silva França (um anjo), que sempre me ajudou, compartilhando seus conhecimentos e me guiando de forma direta para a elaboração deste trabalho.

Ao técnico do laboratório de Fitopatologia do CCTA, Tiago Cardoso, pela contribuição no momento dos resultados.

Ao Diretor Geral das Faculdades Integradas de Patos, que me dispensou do horário de expediente para que eu pudesse cumprir minhas atividades como discentes neste mestrado.

Ao Coordenador do Curso Superior de Tecnologia em Radiologia, Bruno Leite, e ao Coordenador do CEP/FIP Flaubert Paiva, pois assim como o diretor, nunca colocaram obstáculos nos momentos em que precisei ausentar-me das minhas atividades.

As minhas colegas e amigas Janete Fernandes e Jociane Estelita, pois sempre me deram força quando eu chegava no trabalho cansada e estressada, e me diziam “calma amiga, vai passar rápido” uma simples frase que levarei por toda minha vida.

Por fim, agradeço a todos que de alguma forma fizeram parte desta conquista.

RESUMO

Avaliou-se o efeito fungitóxico *in vitro* de óleos essenciais de copaíba (*Copaifera* sp.) E eucalipto (*Eucalyptus* sp.) sobre o crescimento micelial de *Alternaria alternata* e *Colletotrichum musae*. O trabalho foi realizado no Centro de Ciência e Tecnologia Agroalimentar da Universidade Federal de Campina Grande, Pombal, Brasil, no período de julho a agosto de 2018. Os experimentos foram conduzidos em delineamentos inteiramente casualizados com sete tratamentos e cinco repetições. Os óleos essenciais foram incorporados ao meio de cultura PDA (Potato-Dextrose-Agar) e vertidos em placas de Petri. Os tratamentos consistiram de quatro concentrações de óleo (0,4, 0,6, 0,8 e 1,0%), um controle negativo (0,0%) e dois controles positivos (os fungicidas Thiram e Mancozebe). Os fungos foram inoculados em placas e incubados por sete dias a 27 ± 2 ° C. O diâmetro das colônias foi medido a cada dia e utilizado para calcular a porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) e índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM). Os óleos de copaíba e eucalipto reduziram o crescimento micelial de *A. alternata* e *C. musae* em todas as concentrações. O óleo de copaíba apresentou inibição moderada, com percentuais médios variando de 26,6 a 33,68% para *A. alternata* e de 39,5 a 49,6% para *C. musae*. O óleo de eucalipto apresentou alta inibição, com médias variando de 30,0 a 79,7% para *A. alternata* e 35,6 para 66,3% para *C. musae*. As concentrações 0,8 e 1,0% apresentaram os maiores valores de inibição em ambos os óleos, porém essas inibições foram menores que as causadas pelos fungicidas. O óleo de eucalipto na concentração 1,31% poderia inibir totalmente *A. alternata*, mas em todos os outros casos, os óleos seriam incapazes de causar inibição total. Óleos de copaíba e eucalipto inibem o crescimento micelial de *A. alternata* e *C. musae* em condições *in vitro*. As concentrações de 0,8 e 1,0% proporcionaram o maior efeito inibitório.

Palavras-chave: Antifúngico; *Copaifera* sp.; *Eucalyptus* sp.; fungitoxidade; crescimento micelial.

ABSTRACT

This study evaluates the *in vitro* fungitoxic effect of copaiba (*Copaifera* sp.) and eucalyptus (*Eucalyptus* sp.) essential oils on the mycelial growth of *Alternaria alternata* and *Colletotrichum musae*. The work was carried out at the Center for Agrifood Science and Technology of the Federal University of Campina Grande, Pombal, Brazil, from July to August 2018. The experiments comprised completely randomized designs with seven treatments and five replicates. Essential oils were incorporated into PDA culture medium (Potato-Dextrose-Agar) and poured into Petri dishes. The treatments consisted of four oil concentrations (0.4, 0.6, 0.8, and 1.0%), a negative control (0.0%) and two positive controls (the fungicides Thiram and Mancozeb). The fungi were inoculated on plates and incubated for seven days at $27\pm 2^{\circ}\text{C}$. The diameter of the colonies was measured every day and used to calculate the percentage of mycelial growth inhibition (PGI) and index of mycelial growth speed (IMGS). Copaiba and eucalyptus oils reduced the mycelial growth of *A. alternata* and *C. musae* in all concentrations. The copaiba oil showed a moderate inhibition, with mean percentages ranging from 26.6 to 33.68% for *A. alternata* and 39.5 to 49.6% for *C. musae*. The eucalyptus oil showed high inhibition, with means ranging from 30.0 to 79.7% for *A. alternata* and 35.6 to 66.3% for *C. musae*. The concentrations 0.8 and 1.0% had the highest inhibition values in both oils, but these inhibitions were lower than the ones caused by the fungicides. The eucalyptus oil at 1.31% could totally inhibit *A. alternata*, but in all other cases, the oils were unable to cause total inhibition. Copaiba and eucalyptus oils inhibit the mycelial growth of *A. alternata* and *C. musae* under *in vitro* conditions. Concentrations of 0.8 and 1.0% provided the highest inhibitory effect.

Keywords: Antifungal; *Copaifera* sp.; *Eucalyptus* sp.; fungitoxicity; mycelial growth.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. A. Efeito de diferentes concentrações do óleo essencial de copaíba sobre a porcentagem de inibição do crescimento micelial de *Alternaria alternata* e *Colletotrichum musae*. **B.** Efeito de diferentes concentrações do óleo essencial de eucalipto sobre a porcentagem de inibição do crescimento micelial de *Alternaria alternata* e *Colletotrichum musae*. A linha vermelha mostra a direção do efeito estimado pela análise de regressão..... 14

Figura 2. A. Porcentagem de inibição do crescimento micelial de *Alternaria alternata* e *Colletotrichum musae* na maior concentração testada do óleo essencial de copaíba e nos tratamentos testemunha. **B.** Porcentagem de inibição do crescimento micelial de *Alternaria alternata* e *Colletotrichum musae* na maior concentração testada do óleo eucalipto e nos tratamentos testemunha..... 17

Figura 3. A. Efeito de diferentes concentrações do óleo essencial de copaíba sobre velocidade de crescimento micelial de *Alternaria alternata* e *Colletotrichum musae*. **B.** Efeito de diferentes concentrações do óleo essencial de eucalipto sobre a porcentagem de inibição do crescimento micelial de *Alternaria alternata* e *Colletotrichum musae*. A linha vermelha mostra a direção do efeito estimado pela análise de regressão..... 18

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	9
2 OBJETIVOS.....	11
2.1 OBJETIVO GERAL.....	11
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
3 MATERIAL E MÉTODO.....	12
3.1 CONDUÇÃO DO EXPERIMENTO.....	12
3.2 TRATAMENTOS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	12
3.3 INSTALAÇÃO E CONDUÇÃO DO EXPERIMENTO.....	12
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	13
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	14
5 CONCLUSÃO.....	20
REFERÊNCIAS.....	21
ANEXOS.....	25

1 INTRODUÇÃO

A produção de frutos tem grande importância econômica no Brasil, especialmente nas regiões Nordeste, Sul e Sudeste, uma vez que as condições climáticas favorecem o desenvolvimento de frutas (ADAMI *et al.*, 2016). A fruticultura contribui para a economia nacional, tanto no mercado interno quanto nas exportações, com uma produção anual de 44 toneladas de frutas, receita bruta de R\$ 33 bilhões e manutenção de R\$ 5 milhões de empregos (BRASIL, 2018).

O Brasil é um dos maiores produtores e exportadores mundiais de alimentos, sendo o terceiro país no ranking de produção de frutas frescas (BUENO; BACCARIN, 2012). No entanto, os problemas fitossanitários enfraquecem o mercado internacional de frutas no Brasil, principalmente devido às doenças pós-colheita que reduzem a qualidade final dos frutos destinados à exportação, o que diminui a produção e acarreta perdas significativas (NASCIMENTO *et al.*, 2014).

Processos infecciosos pós-colheita são latentes. Os fitopatógenos se estabelecem na fase pré-colheita quando os frutos ainda estão saudáveis. Porém, os sintomas das doenças surgem apenas durante a pós-colheita, quando o amadurecimento favorece o desenvolvimento dos patógenos. Este processo ocorre principalmente durante a preparação dos frutos para comercialização (CAMARGO *et al.*, 2011).

Os fungos *Alternaria alternata* e *Colletotrichum musae* estão entre os principais fitopatógenos causadores de doenças pós-colheita. *A. alternata* causa podridão pós-colheita em mamão (*Carica papaya* L.) (BARBOZA, 2015) e melão (*Cucumis melo* L.) (NASCIMENTO *et al.*, 2014) e manchas superficiais em tangerina (*Citrus reticulata*) (AZEVEDO *et al.*, 2010) e manga (*Mangifera indica* L.) (DROBY; PRUSKY, 1987). *C. musae* é um fitopatógeno amplamente distribuído, que causa antracnose e doença da podridão da coroa [GRIFFE, 1973; WILSON *et al.*, 1999; BASTOS; ALBUQUERQUE, 2004; BONNET *et al.*, 2013], sendo estas as principais doenças pós colheita da banana (*Musa* spp.), em todas as regiões produtoras do mundo.

Os agricultores brasileiros, geralmente, controlam as doenças causadas por fungos usando produtos químicos altamente tóxicos que contaminam o meio ambiente e prejudicam a saúde humana (FARIA *et al.*, 2007; RIGOTO *et al.*, 2013; ADAMI *et al.*, 2016). O uso de agrotóxicos limita a exportação de frutas devido às regras rígidas para o registro em mercados

exigentes, como os países europeus, e os resíduos deixados na alimentação (MARINHO, 2010; SILVA *et al.*, 2014).

A busca por produtos naturais tem aumentado em todo o mundo, principalmente devido a problemas causados por diversos produtos sintéticos ao meio ambiente e à saúde humana (BANDONI; CZEPACK, 2008). Novas tecnologias e pesquisas beneficiaram controles complementares ou alternativos para doenças de plantas. Nesse sentido, os óleos essenciais apresentam diversas propriedades desejáveis quando comparados a outros agroquímicos, como a ação larvicida e fungicida (CARMO *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2008), baixos riscos ao meio ambiente e à saúde humana e baixo custo na produção (NASCIMENTO *et al.*, 2013).

Os óleos essenciais de eucalipto (*Eucalyptus* spp.) e copaíba (*Copaifera* spp.) mostraram atividade antimicrobiana em vários estudos. Por exemplo, óleos essenciais de eucalipto apresentaram capacidade fungitóxica contra *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* e *Bipolaris sorokiniana* (SALGADO *et al.*, 2003), enquanto o óleo de copaíba reduziu o crescimento de *Colletotrichum gloeosporioides* (SOUSA *et al.*, 2012), *Aspergillus* spp. (DEUS *et al.*, 2011) e *Scytalidium lignicola* (SOBRAL *et al.*, 2006).

A concentração de óleo interfere nas atividades fungicidas e fungistáticas. O mesmo óleo pode apresentar um amplo espectro de ação contra diferentes espécies de microorganismos, variando nas suas concentrações inibitórias mínimas em cada espécie (ANTUNES; CAVACOB, 2010). Por exemplo, o óleo de eucalipto (*Eucalyptus globulus*) apresentou diferentes concentrações inibitórias mínimas de acordo com os fungos combatidos (TYAGI; MALIK, 2010).

Neste sentido, este trabalho teve como objetivo avaliar *in vitro* o efeito fungitóxico dos óleos essenciais de eucalipto e copaíba, sobre o crescimento micelial de *Alternaria alternata* e *Colletotrichum musae*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar *in vitro* o efeito fungitóxico dos óleos essenciais de eucalipto e copaíba sobre o crescimento micelial de *Alternaria alternata* e *Colletotrichum musae*;

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar o efeito das diferentes concentrações dos óleos no controle do crescimento micelial de *Alternaria alternata* e *Colletotrichum musae*;
- Comparar o efeito dos óleos essenciais com fungicidas comerciais.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CONDUÇÃO DO EXPERIMENTO

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia do Centro de Ciências e Tecnologia Agroalimentar (CCTA) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), campus de Pombal, no período de julho a agosto de 2018.

Para a realização do experimento foram utilizadas as estirpes 3499 de *Colletotrichum musae* e 0878 de *Alternaria alternata*, cedidas pela coleção de cultura de fungos fitopatogênicos Prof. Maria Menezes da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Os óleos essenciais utilizados foram o de Eucalipto (*Eucalyptus* sp.) e Copaíba (*Copaífera* sp.), obtidos comercialmente em loja de produtos naturais.

3.2 TRATAMENTOS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O experimento foi conduzido no delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC) com 7 tratamentos (4 dosagens do óleo, 1 testemunha negativa e 2 testemunhas negativas) em cinco repetições cada. Os tratamentos consistiram do meio de cultura autoclavado suplementado com os óleos nas seguintes concentrações: 0,0; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0%; a testemunha negativa consistiu no meio de cultura sem a suplementação dos óleos essenciais; as testemunhas positivas consistiram na suplementação com dois fungicidas tiram e mancozebe, nas doses recomendadas pelos fabricantes: (250 $\mu\text{L L}^{-1}$) e (0,2 g L^{-1}), respectivamente. As concentrações do óleo foram estabelecidas com base no estudo realizado por Ugulino et al. (2018).

3.3 INSTALAÇÃO E CONDUÇÃO DO EXPERIMENTO

Os óleos essenciais de eucalipto e copaíba foram incorporados ao meio de cultura BDA (*Batata Dextrose Ágar*) autoclavado e fundente. Após o resfriamento, o meio foi vertido em placas de Petri de 7,5 cm de diâmetro em condições assépticas. Discos de meio de cultura com 1 cm de diâmetro contendo micélios dos fungos foram transferidos para o centro de cada placa contendo os tratamentos. Em seguida, as placas foram envolvidas em plástico filme e incubadas em estufa do tipo B.O.D (*Biochemical Oxygen Demand*) a temperatura de 27 ± 2 °C.

O crescimento das colônias foi mensurado diariamente até que a colônia tomasse toda a superfície do meio de cultura de uma das placas ou no período máximo de 7 dias. A avaliação do crescimento micelial consistiu em medições diárias do diâmetro das colônias obtido através da média de duas medidas perpendiculares, com o auxílio de régua graduada, obtendo-se a média do crescimento diário para cada repetição de cada tratamento. Com o resultado das medidas, foram calculados a porcentagem de inibição micelial (PIC; BASTOS, 1997) e o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM; OLIVEIRA, 1991), de acordo com as fórmulas (1) e (2):

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

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

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram realizadas regressões lineares e quadráticas para verificar o efeito da concentração dos óleos sobre o crescimento dos fungos. Como em alguns casos o valor de R² foi muito próximo entre o modelo linear e o quadrático, utilizamos o Critério de Informação de Akaike (AIC) para decidir qual modelo representa melhor a relação óleo versus fungo. Simplificadamente, quanto menor o valor AIC melhor o modelo. Apenas o melhor modelo foi representado em gráfico. A significância de cada termo das equações foi avaliada utilizando-se o teste T.

Testes de hipótese para verificar a significância da diferença entre o tratamento com maior concentração dos óleos (1%) e os tratamentos com fungicidas (Tiram e Mancozebe). Utilizamos os testes não-paramétricos Kruskal-Wallis seguido da comparação múltipla de Wilcoxon por que os dados não satisfizeram o pressuposto de distribuição de probabilidades normal da ANOVA e do teste de Tukey. Todas as análises foram realizadas no programa R Core Team 3.5.1. Foram consideradas significativas as diferenças com valor de probabilidade abaixo de 5%.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as concentrações de óleos de copaíba e eucalipto reduziram o crescimento micelial de *Alternaria alternata* e *Colletotrichum musae* (Figura 1). As maiores concentrações (0,8 e 1,0%) proporcionaram as melhores inibições de crescimento. Nessas concentrações, respectivamente, o óleo de copaíba inibiu 31,4 e 33,7% de *A. alternata* e 46,9 e 49,6% de *C. musae*, enquanto o óleo de eucalipto inibiu 52,6 e 79,6% de *A. alternata* e 66,3 e 41,2% de *C. musae*.

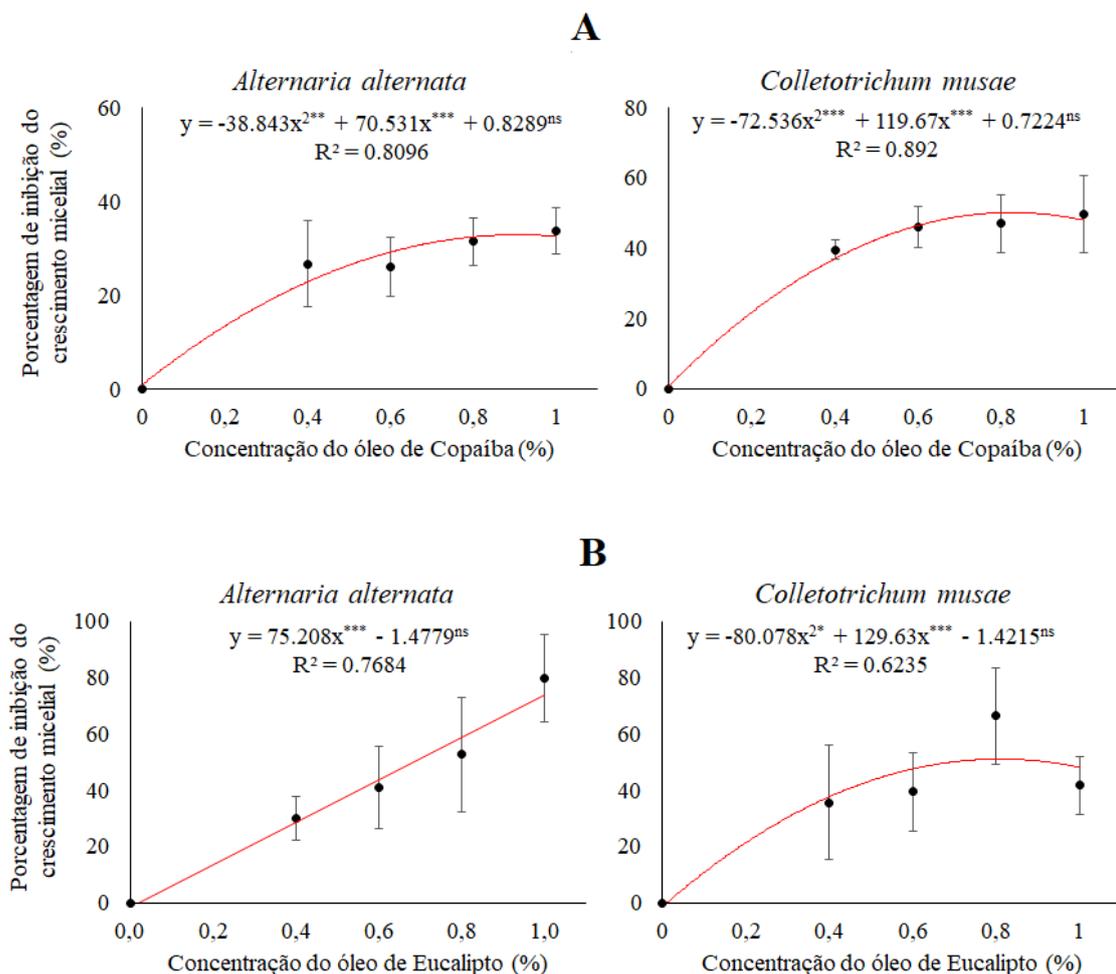


Figura 1. A. Efeito de diferentes concentrações do óleo essencial de copaíba sobre a porcentagem de inibição do crescimento micelial de *Alternaria alternata* e *Colletotrichum musae*. **B.** Efeito de diferentes concentrações do óleo essencial de eucalipto sobre a porcentagem de inibição do crescimento micelial de *Alternaria alternata* e *Colletotrichum musae*. A linha vermelha mostra a direção do efeito estimado pela análise de regressão.

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; ns: Não significativo.

Óleo de copaíba: *Alternaria alternata* ($F = 46.78$, $p = 1.191e-08$); *Colletotrichum musae* ($F = 90.82$, $p = 2.339e-11$).

Óleo de eucalipto: *Alternaria alternata* ($F = 76.29$, $p = 9.205e-09$); *Colletotrichum musae* ($F = 18.22$, $p = 2.155e-05$).

Comparando as mesmas concentrações, as inibições causadas por ambos os óleos contra *A. alternata* e *C. musae* diferiram das inibições causadas em outros fungos. Por exemplo, os óleos de copaíba e eucalipto teve baixo efeito fungitóxico no crescimento de *Macrophomina phaseolina*. Ugulino *et al.* (2018) relataram as inibições máximas de 33 e 21%, respectivamente. Por outro lado, estes óleos exercem moderada a alta inibição no crescimento de *Colletotrichum gloeosporioides*. Sousa *et al.* (2012), também utilizando os óleos de copaíba e eucalipto, encontraram reduções de 50 e 100% no crescimento de *C. gloeosporioides*.

Os óleos de copaíba e eucalipto exibiram um efeito dependente da dose quando testados no controle de *A. alternata* e *C. musae*, ou seja, a inibição aumentou com a dosagem utilizada. Ugulino *et al.* (2018), ao testar o efeito do óleo de copaíba no controle de *M. phaseolina*, obtiveram o resultado oposto ao nosso, a maior inibição ocorreu na menor dose testada (0,4%), com maior crescimento micelial nas maiores concentrações de óleo.

Assim, o aumento do poder inibitório em função da concentração de óleo depende das espécies de microrganismos estudadas. Em alguns organismos, o aumento da concentração potencializa o efeito inibitório, em outros, o efeito pode ser reduzido, o que gera o desperdício do produto.

De acordo com os resultados da regressão, a inibição total poderia ser alcançada apenas quando se utiliza óleo de eucalipto contra *A. alternata* em uma concentração de 1,31%. Nos demais casos, a modelagem sugere que os óleos são incapazes de inibir 100% do crescimento micelial. Portanto, sugerimos que os valores máximos de inibição foram obtidos entre as concentrações testadas no presente estudo. A utilização de concentrações superiores a 1,0% no controle de *A. alternata* e *C. musae* seria economicamente inviável.

Em contraste com nossos resultados, testes feitos com óleo de diferentes espécies de eucalipto (SALGADO *et al.*, 2003) ou diferentes partes da mesma planta (DAWAR *et al.*, 2007) mostraram aumento da inibição com o aumento das concentrações. Portanto, vários fatores podem afetar a composição química do óleo, que por sua vez influencia sua atividade biológica. Alguns exemplos são os fatores genéticos da planta (MORAIS *et al.*, 2009), fatores ecológicos em torno da planta e condições edafoclimáticas (clima, temperatura e tipo de solo) (ANDRADE *et al.*, 2012).

As técnicas de cultivo aplicadas ao material vegetal utilizado para obter o óleo também afetam sua composição química, como o período de colheita, o preparo do material antes da extração e a parte da planta utilizada na produção de óleo (MAIA *et al.*, 2015).

No presente estudo, o óleo de copaíba causou inibição moderada no crescimento micelial de ambos os fungos, pois não atingiu 50% de inibição. O óleo de eucalipto causou alta inibição, pois reduziu 79,6% do crescimento de *A. alternata* e 66,3% de *C. musae*. França et al. (FRANÇA *et al.*, 2018), ao avaliarem o efeito do óleo de hortelã-pimenta sobre o crescimento de *A. alternata*, também obtiveram moderada inibição, uma vez que as maiores concentrações, 0,8 e 1,0%, inibiram apenas 41,6 e 37,1%, respectivamente.

Outros óleos vegetais apresentaram resultados superiores, por exemplo, o óleo essencial de tangerina (*Citrus reticulata*) inibiu 84% do crescimento de *A. alternata* na concentração de 0,1 mL 100 mL⁻¹, enquanto que a 0,2 mL 100 mL⁻¹ o óleo causou inibição total (CHUTIA *et al.*, 2009). O óleo essencial de *Lippia gracilis* promoveu inibição completa de *Alternaria* sp. crescimento na concentração de 750 µL L⁻¹ (BARBOZA, 2015). O óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus*) apresentou concentração inibitória mínima de 14,49 µg mL⁻¹ no crescimento de *A. alternata* (GUIMARÃES *et al.*, 2011).

Durante os testes *in vitro* para controle de *Colletotrichum musae*, o óleo de pimenta de macaco (*Piper aduncum*) inibiu 100% do crescimento micelial e germinação de esporos nas concentrações de 100 µg mL⁻¹ e 150 µg mL⁻¹, enquanto no controle *in vivo* da podridão em frutos de banana prata, a melhor inibição foi obtida com o óleo na concentração de 1,0% (BASTOS; ALBUQUERQUE, 2004).

O efeito antifúngico dos óleos testados foi geralmente menor do que o obtido pelos fungicidas comerciais (Tiram e Mancozebe) (Figura 2).

No controle de *A. alternata*, a inibição causada pelo óleo de copaíba teve efeito mais fraco em relação aos fungicidas, enquanto o óleo essencial de eucalipto na maior concentração teve o mesmo efeito do fungicida mancozebe e menor efeito que o fungicida thiram. No controle de *C. musae*, a inibição fúngica promovida por ambos os óleos na maior concentração foi inferior aos dois fungicidas.

Os melhores resultados quanto à inibição do crescimento foram obtidos nas maiores concentrações (0,8 e 1,0%). Nestas, o óleo de copaíba inibiu em média 31,4 e 33,7% de *A. alternata* e 46,9 e 49,6% de *C. musae*. Enquanto o óleo de eucalipto inibiu, em média, 52,6 e 79,6% de *A. alternata*; e 66,3 e 41,2% de *C. musae*.

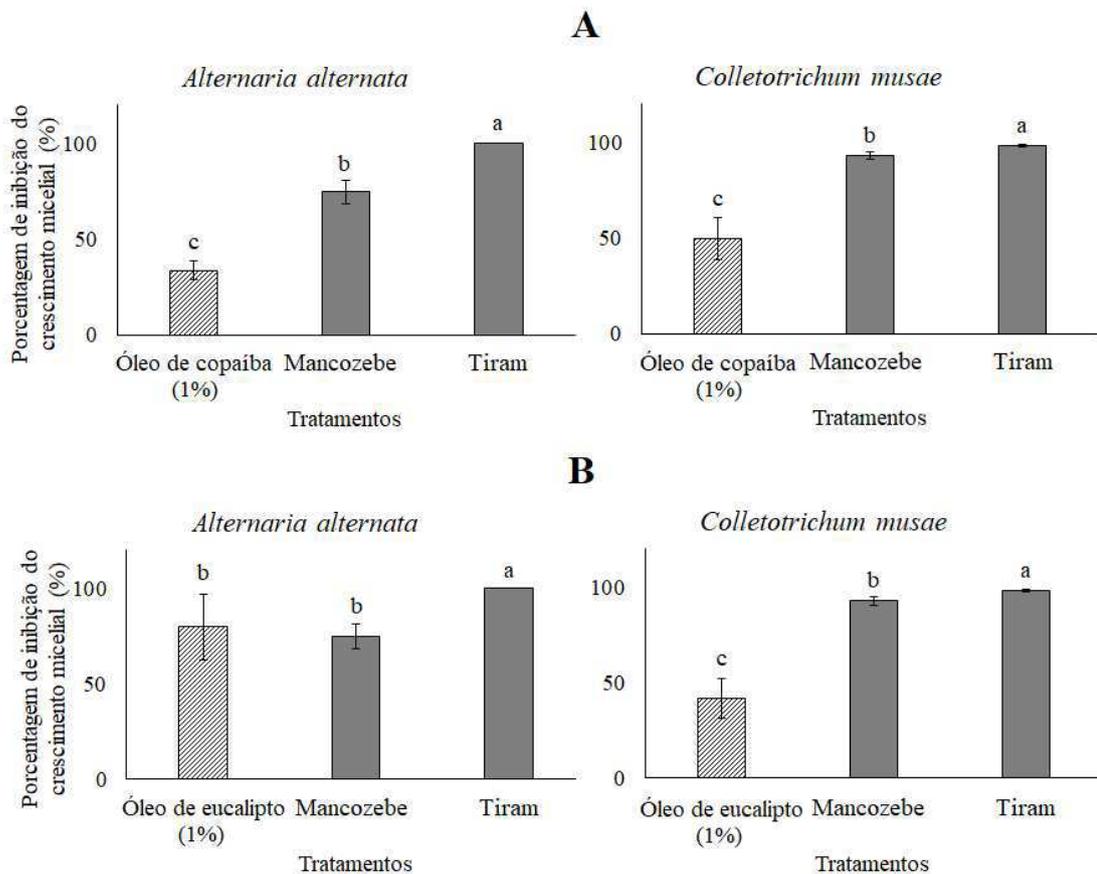


Figura 2. A. Porcentagem de inibição do crescimento micelial de *Alternaria alternata* e *Colletotrichum musae* na maior concentração testada do óleo essencial de copaíba e nos tratamentos testemunha. **B.** Porcentagem de inibição do crescimento micelial de *Alternaria alternata* e *Colletotrichum musae* na maior concentração testada do óleo eucalipto e nos tratamentos testemunha.

A velocidade de crescimento micelial de *A. alternata* e *C. musae* diferiu significativamente entre as concentrações de óleos (Figura 3).

Os tratamentos com concentrações de 0,8 e 1,0% reduziram a taxa de crescimento de *A. alternata* para 0,44 e 0,43 cm dia⁻¹ utilizando óleo de copaíba e 0,3 e 0,1 cm dia⁻¹ utilizando óleo de eucalipto, ambos diferindo do controle negativo, que apresentou a maior taxa de crescimento (0,64 cm dia⁻¹). Os tratamentos nas mesmas concentrações acima reduziram a taxa de crescimento de *C. musae* para 0,62 e 0,59 cm dia⁻¹ utilizando óleo de copaíba e 0,41 e 0,69 cm dia⁻¹ utilizando óleo de eucalipto, ambos diferindo do controle negativo (1,18 cm dia⁻¹).

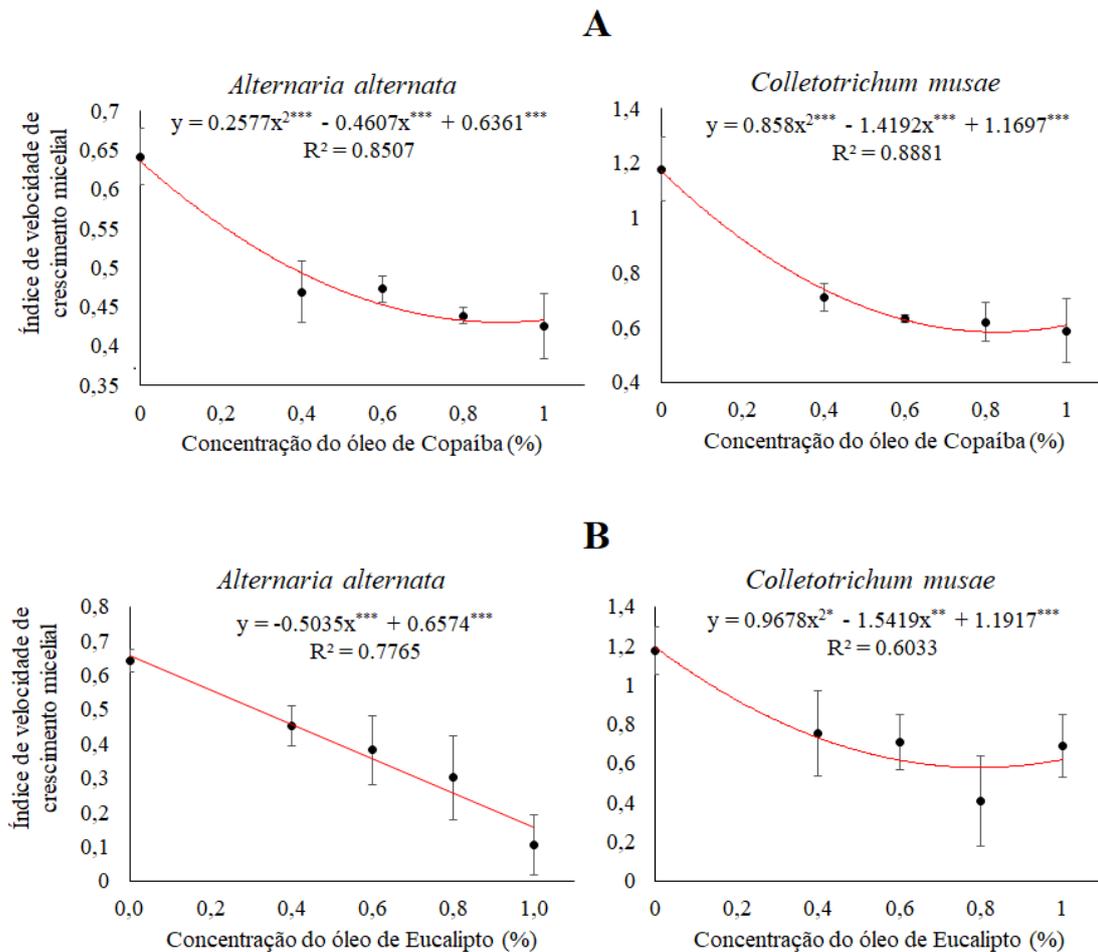


Figura 3. A. Efeito de diferentes concentrações do óleo essencial de copaíba sobre velocidade de crescimento micelial de *Alternaria alternata* e *Colletotrichum musae*. **B.** Efeito de diferentes concentrações do óleo essencial de eucalipto sobre a porcentagem de inibição do crescimento micelial de *Alternaria alternata* e *Colletotrichum musae*. A linha vermelha mostra a direção do efeito estimado pela análise de regressão.

*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

Óleo de copaíba: *Alternaria alternata* ($F = 62.66$, $p = 8.242e-10$); *Colletotrichum musae* ($F = 87.32$, $p = 3.439e-11$).

Óleo de eucalipto: *Alternaria alternata* ($F = 79.89$, $p = 6.081e-09$); *Colletotrichum musae* ($F = 16.73$, $p = 3.828e-05$).

Os resultados obtidos no presente estudo sugerem a existência de compostos biologicamente ativos nos óleos essenciais de copaíba e eucalipto, que garantem uma atividade antifúngica contra *Alternaria alternata* e *Colletotrichum musae* em condições *in vitro*. A baixa toxicidade e a rápida degradação no ambiente conferem vantagens aos óleos essenciais sobre os agroquímicos convencionalmente utilizados no controle de fitopatógenos (COIMBRA et al., 2006). Além disso, o baixo custo de produção e a redução dos riscos à saúde dos produtores e consumidores finais aumentam os benefícios desses produtos.

Nesta perspectiva, os resultados deste trabalho fornecem informações para a elaboração de produtos naturais para culturas agroecológicas, visando reduzir o uso de fungicidas convencionais. Sugerimos o estudo do controle *in vivo* de *A. alternata* e *C. musae* para avaliar a atividade dos óleos em diferentes espécies de plantas e estabelecer as concentrações inibitórias seguras desses produtos.

5 CONCLUSÃO

Os óleos essenciais de copaíba (*Copaífera* sp.) e eucalipto (*Eucalyptus* sp.) inibem o crescimento de *Alternaria alternata* e *Colletotrichum musae* em condições *in vitro*, sendo as concentrações 0,8 e 1,0% as que promoveram o maior efeito inibitório.

REFERÊNCIAS

- ADAMI, A.C. de O.; SOUSA, E.P. de. FRICKS, L.B.; MIRANDA, S.H.G. de. Oferta de exportação de frutas do brasil: o caso da manga e do melão, no período de 2004 a 2015. **Rev. Econ. NE**, Fortaleza, v.47, n.4, p.63-78, 2016.
- ANDRADE, M.A.; DAS GRAÇAS C. M.; BATISTA, L.R; TEIXEIRA MALLETT, A.C.; FERNANDES MACHADO, S.M. Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: Composição, atividades antioxidante e antibacteriana. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, n. 2, p. 399-408, 2012.
- ANTUNES, M.D.C.; CAVACOB, A.; The use of essential oils for postharvest decay control. A review. **Flavour Fragrance Journal**. v.25, p.351-366, 2010.
- AZEVEDO, F.A.; POLYDORO, D.A.; BASTIANEL, M.; KUPPER, K.C.; STUART, R.M.; COSTA, F.P.; PIO, R.M. Resposta de diferentes genótipos de tangerinas e seus híbridos à inoculação *in vitro* e *in vivo* de *Alternaria alternata*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, p. 1-8, 2010.
- BANDONI, A.L.; CZEPACK, M.P. **Os recursos vegetais aromáticos no Brasil**. Vitoria: Edufes, 2008. 624p.
- BARBOZA, H.S. **Efeito fungitóxico do óleo essencial de alecrim-da-chapada em *Alternaria sp.*** 2015. 31fls. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Agronomia) – Universidade Federal do Semi-Árido, Mossoró. 2015.
- BASTOS, C.N.; ALBUQUERQUE, P.S.B. Efeito do óleo de *Piper aduncum* no controle em pós-colheita de *Colletotricum musae* em banana. **Fitopatol. bras.**, v.29, n.5, p.555-557, 2004.
- BASTOS, C.N. Efeito do óleo de *Piper aduncum* sobre *Crinipelis* e outros fungos fitopatogênicos. **Fitopatologia Brasileira**, v.22, n.3, p.441-3, 1997.
- BONETT, L.P.; HURMANN, E.de S.; POZZA-JÚNIOR, M.B.; ROSA, T.B. Biocontrole *in vitro* de *Colletotrichum musae* por Isolados de *Trichoderma spp.* **Uniciências**, v.17, n.1, p. 5-10, 2013.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Plano Nacional de Desenvolvimento da Fruticultura**. Publicado em 27 de fevereiro de 2018. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/noticias/mapa-lanca-plano-de-fruticultura-em-parceria-com-o-setor-privado/PlanoNacionaldeDesenvolvimentodaFruticulturaMapa.pdf>.
- BUENO, G.; BACCARIN, J.G. Participação das principais frutas brasileiras no comércio internacional: 1997 a 2008. **Rev. Bras. Frutic.**, v.34, n.2, p.424-434, 2012.
- CAMARGO, R.B.; PEIXOTO, A.R.; TERAÓ, D.; ONO, E.O.; CAVALCANTI, S.L.S. Fungos causadores de podridões pós-colheita em uvas apirênicas no pólo agrícola de Juazeiro-BA e Petrolina-PE. **Revista caatinga**, Mossoró-RN, v. 24, n.1, p.15-19, 2011.

- CARMO, E.S.; LIMA, E.O.; SOUZA, E.L. The potential of *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) essential oil in inhibiting the growth of some food-related *Aspergillus* species. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.39, n.2, p.362-367, 2008.
- CHUTIA, M.; DEKA BHUYAN, P.; PATHAK, M. G.; SARMA, T.C.; BORUAH, P. Antifungal activity and chemical composition of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against phytopathogens from North East India. **LWT - Food Science and Technology**. v.42, p.777–780, 2009.
- COIMBRA, J. L.; SOARES, A. C. F.; GARRIDO, M. D. S.; SOUSA, C. D. S. & RIBEIRO, F. L. B. Toxicity of plant extracts to *Scutellonema bradys*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.7, p.1209-1211, 2006.
- DAWAR, S.; YOUNUS, S.M.; TARIQ, M.; ZAKI, J. Use of *Eucalyptus* sp., in the control of root infecting fungi on mung bean and chick pea. **Pak. J. Bot.**, v.39, n.3, p. 975-979, 2007.
- DEUS, R.J.A.; ALVES, C.N.; ARRUDA, M.S.P. Avaliação do efeito antifúngico do óleo resina e do óleo essencial de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne). **Rev. Bras. Pl. Med.**, v.13, n.1, p.1-7, 2011.
- DROBY, S. PRUSKY, D. Induction of antifungal resorcinols in flesh of unripe mango fruits and its relation to latent infection by *Alternaria alternata*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.30, p.285-292, 1987.
- FARIA, N.M.X.; FASSA, A.G.; FACCHINI, L.A. Intoxicação por agrotóxicos no Brasil: Os sistemas oficiais de informação e desafios para a realização de estudos epidemiológicos. **Ciência e Saúde coletiva.**, v.12, n.1, p.25-38, 2007.
- FRANÇA, K.R.S.; SILVA, T.L.; CARDOSO, T.A.L.; UGULINO, A.L.N.; RODRIGUES, A.P.M.; MENDONÇA JÚNIOR, A.F. *In vitro* effect of essential oil of peppermint (*Mentha x piperita* L.) on the mycelial growth of *Alternaria alternata*. **Journal of Experimental Agriculture International.**, v.25, n.5, p.1-7, 2018.
- GRIFFEE, P.J. Resistance to benomyl and related fungicides in *Colletotrichum musae*. **Trans. Br. mycol. Soc.**, v.60, n.3, p. 433- 439, 1973.
- GUIMARÃES, L.G.L.; CARDOSO, M.G.; DE SOUSA, P.E.; DE ANDRADE, J.; VIEIRA, S.S. Atividades antioxidante e fungitóxica do óleo essencial de capim-limão e do citral. **Revista Ciência Agrônômica.**, v.42, n.2, p.464-472, 2011.
- MAIA, T.F.; DONATO, A. De.; FRAGA, M.E. Atividade antifúngica de óleos essenciais de plantas. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.17, n.1, p.105-116, 2015.
- MARINHO, A.M.C.P. **Contextos e contornos da modernização agrícola em municípios do Baixo Jaguaribe – CE: o espelho do (des)envolvimento e seus reflexos na saúde, trabalho e ambiente.** [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP. 2010.
- MORAIS, L.A.S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Hortic. bras.**, v. 27, n. 2, p. 4050-4063, 2009.

NASCIMENTO, F.V.; SANTOS, M.C.; VALDEBRITO-SANHUEZA, R. M.; BARTNICKI, V.A. Hidrotermia e radiação UV-C no controle de patógenos de manga e melão. **Summa Phytopathol.**, Botucatu, v. 40, n. 4, p. 313-317, 2014.

NASCIMENTO, S. M. C.; CARVALHO, E. A.; WARWICK, D. R. N.; PALHETA, J. G.; DOS SANTOS, T. P. F. **Inibição do crescimento micelial de *Thielaviopsis paradoxa* por óleos vegetais.** In: ENCONTRO AMAZÔNICO DE AGRÁRIAS, 5., 2013, Belém, PA. A importância da tecnologia e do empreendedorismo no desenvolvimento amazônico. Belém, PA: UFRA, 2013:1-5.

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

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria; 2018. Disponível em: <https://www.R-project.org/>

RIGOTTO, R. M.; DA SILVA, A. M. C.; FERREIRA, M. J. M.; ROSA, I. F.; AGUIAR, A.C.P. Tendências de agravos crônicos à saúde associados a agrotóxicos em região de fruticultura no Ceará, Brasil. **Revista Brasileira de Epidemiologia.**, v.16, n.3, p.763-773, 2013.

SALGADO, A.P.S.; CARDOSO, M.G.; SOUZA, P.E.; SOUZA, J.A.; ABREU, C.M.P.; PINTO, J.E.B.P. Avaliação da atividade fungitóxica de óleos essenciais de folhas de *Eucalyptus* sobre *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* e *Bipolaris sorokiniana*. **Ciência Agrotécnica.**, v.27, n.2, p.249-254, 2003.

SILVA, A.C.; SOUZA, P.E.; RESENDE, M.L.V.; SILVA JÚNIOR, M.B.; RIBEIRO JÚNIOR, P.M.; ZEVIANI, W.M. Local and systemic control of powdery mildew in eucalyptus using essential oils and decoctions from traditional Brazilian medicinal plants. **Forest Pathology.**, v.44, p.145-153, 2014.

SILVA, W.J.; DÓRIA, G.A.A.; MAIA, R.T.; NUNES, R.S.; CARVALHO, G.A.; BLANK, A.F.; ALVES, P.B.; MARÇAL, R.; CAVALCANTI, S.C.H. Effects of essential oils on *Aedes aegypti* larvae: Alternatives to environmentally safe insecticides, **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3251–3255, 2008.

SOBRAL, M.F.; CARNAUBA, J.P.; SILVA, J.C.; AMORIM, E.P.R. Efeito *in vitro* de óleos de andiroba e copaíba no crescimento micelial de *Scytalidium lignicola*. **Fitopatologia Brasileira.**, v31, p.12, 2006.

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

TYAGI, A.K.; MALIK, A. Antimicrobial potential and chemical composition of *Eucalyptus globulus* oil in liquid and vapour phase against food spoilage microorganisms. **Food Chemistry.**, v.126, p.228-235, 2011.

UGULINO, A.L.N.; MENDONÇA JÚNIOR, A.F.; RODRIGUES, A.P.M.; SANTOS, A.B.; FRANÇA, K.R.S.; CARDOSO, T.A.L.; PRADO JÚNIOR, L.D. Inhibition Effect of Vegetable Oils on the Mycelial Growth of *Macrophomina phaseolina* (Tassi.). Goid. **Journal of Agricultural Science.** v.10, n. 6, p. 49-56, 2018.

WILSON, M.R.; GALLIMORE, W.A.; REESE, P.B. Steroid transformations with *Fusarium oxysporum* var. *cubense* and *Colletotrichum musae*. **Steroids.**, v.64, p.834-843, 1999.

ANEXOS

Fungitoxic potential of copaiba and eucalyptus essential oils on phytopathogens

Lídia Pinheiro da Nóbrega¹, Kevison Romulo da Silva França^{1*}, Tiago Silva Lima¹, Flávia Mota de Figueredo Alves¹, Andressa Lacerda Nóbrega Ugulino¹, Aguinaldo Matias da Silva², Tiago Augusto Lima Cardoso³, Ana Paula Medeiros Rodrigues⁴ and Antônio Francisco de Mendonça Júnior⁵

¹Postgraduate in Agroindustrial Systems, Federal University of Campina Grande, Pombal, PB, Brazil

²Bachelor of Laws, Brazilian Faculty of Legal Sciences, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

³Phytopathology Laboratory, Federal University of Campina Grande, Pombal, PB, Brazil

⁴Postgraduate in Agronomy/Plant Protection, Rural Federal University of Semiarid, Mossoró, RN, Brazil

⁵Agronomy Department, Rural Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil

ABSTRACT

Aims: This study evaluates the *in vitro* fungitoxic effect of copaiba (*Copaifera* sp.) and eucalyptus (*Eucalyptus* sp.) essential oils on the mycelial growth of *Alternaria alternata* and *Colletotrichum musae*.

Study design: The experiments comprised completely randomized designs with seven treatments and five replicates.

Place and Duration of Study: The work was carried out at the Center for Agrifood Science and Technology of the Federal University of Campina Grande, Pombal, Brazil, from July to August 2018.

Methodology: Essential oils were incorporated into PDA culture medium (Potato-Dextrose-Agar) and poured into Petri dishes. The treatments consisted of four oil concentrations (0.4, 0.6, 0.8, and 1.0%), a negative control (0.0%) and two positive controls (the fungicides Thiram and Mancozeb). The fungi were inoculated on plates and incubated for seven days at 27±2°C. The diameter of the colonies was measured every day and used to calculate the percentage of mycelial growth inhibition (PGI) and index of mycelial growth speed (IMGS).

Results: Copaiba and eucalyptus oils reduced the mycelial growth of *A. alternata* and *C. musae* in all concentrations. The copaiba oil showed a moderate inhibition, with mean percentages ranging from 26.6 to 33.68% for *A. alternata* and 39.5 to 49.6% for *C. musae*. The eucalyptus oil showed high inhibition, with means ranging from 30.0 to 79.7% for *A. alternata* and 35.6 to 66.3% for *C. musae*. The concentrations 0.8 and 1.0% had the highest inhibition values in both oils, but these inhibitions were lower than the ones caused by the fungicides. The eucalyptus oil at 1.31% could totally inhibit *A. alternata*, but in all other cases, the oils were unable to cause total inhibition.

Conclusion: Copaiba and eucalyptus oils inhibit the mycelial growth of *A. alternata* and *C. musae* under *in vitro* conditions. Concentrations of 0.8 and 1.0% provided the highest inhibitory effect.

Keywords: Antifungal; *Copaifera* sp.; *Eucalyptus* sp.; fungitoxicity; mycelial growth.

1. INTRODUCTION

Fruit production has great economic importance in Brazil, especially for the northeastern, southern, and southeastern regions, given that climatic conditions benefit the development of fruits [1]. Fruticulture contributes to the national economy both in the domestic market and exports with an annual production of 44 tons of fruit, a gross income of R\$ 33 billion, and the maintenance of 5 million jobs [2].

Brazil is among the largest producers and exporters of food worldwide, being the third country in the ranking of fresh fruits production [3]. However, phytosanitary problems weaken the Brazilian international market of fruits, primarily due to the post-harvest diseases that reduce the final quality of fruits intended to export, which decreases production and entails significant losses [4].

Post-harvest infectious processes are latent. The phytopathogens establish in the pre-harvest stage when the fruits are still healthy. However, the symptoms of diseases appear only during the post-harvest, when the ripening favors the development of the pathogens. This process occurs mainly during the preparation of fruits for commercialization [5].

The fungi *Alternaria alternata* and *Colletotrichum musae* are among the main phytopathogens of post-harvest diseases. *A. alternata* causes post-harvest rot in papaya (*Carica papaya* L.) [6] and melon (*Cucumis melo* L.) [4], and superficial spots on mandarin (*Citrus reticulata*) [7] and mango (*Mangifera indica* L.) [8]. *C. musae* is a widely distributed phytopathogen that causes anthracnose and crown rot disease [9,10,11,12], major post-harvest banana diseases (*Musa* spp.) in all producing regions of the world.

Brazilian farmers usually control the diseases caused by fungi using highly toxic chemicals that contaminate the environment and impair human health [1,13,14]. The use of pesticides limits the export of fruit due to the hard rules for the registration in demanding markets, such as European countries, and the residues left in food [15,16].

The search for natural products has increased worldwide, mainly due to problems caused by several synthetic products to the environment and human health [17]. New technologies and research have benefited complementary or alternative controls to plant diseases. In this sense, essential oils have several desirable properties when compared to other agrochemicals, such as larvicidal and fungicidal action [18,19], low risks to the environment and human health, and low cost [20].

The essential oils of eucalyptus (*Eucalyptus* spp.) and copaiba (*Copaifera* spp.) have shown antimicrobial activity in several studies. For example, eucalyptus essential oils showed fungitoxic capacity against *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*, and *Bipolaris sorokiniana* [21], while the copaiba oil reduces the growth of *Colletotrichum gloeosporioides* [22], *Aspergillus* spp. [23] and *Scytalidium lignicola* [24].

The oil concentration interferes in its fungicidal and fungistatic activities. The same oil having a broad spectrum of action against different species of microorganisms may vary its minimum inhibitory concentrations for each species [25]. For example, eucalyptus oil (*Eucalyptus globulus*) has different minimum inhibitory concentrations according to the combated fungus [26].

In this sense, this study aimed to evaluate *in vitro* the fungitoxic effect of the essential oils of eucalyptus and copaiba on the mycelial growth of *Alternaria alternata* and *Colletotrichum musae*.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Conduction of the experiments

The study was carried out in the Laboratory of Phytopathology, Federal University of Campina Grande, Campus of Pombal-PB, between July and August of 2018. We developed four experiments, each one consisting of one type of essential oil against one species of fungus. The trials comprised completely randomized designs with seven treatments and five replicates each.

We used the 0878 strain of *Alternaria alternata* and 3499 of *Colletotrichum musae* provided by the collection of phytopathogenic fungi Prof. Maria Menezes of the Federal Rural University of Pernambuco. The pure essential oils of copaiba and eucalyptus were purchased at a local store specialized in natural products.

The oils were added to autoclaved PDA culture medium (Potato Dextrose Agar), on the following concentrations (treatments): 0.0%; 0.4%; 0.6%; 0.8%, and 1.0%. The 0.0% treatment comprised a negative control. The positive controls consisted of supplementing the culture medium with two commercial fungicides, thiram and mancozeb, at the doses recommended by the manufacturers, 250 $\mu\text{L L}^{-1}$ and 0.2 g L^{-1} , respectively. The concentrations of the oils were chosen based on a study by Ugulino et al. [27].

After cooling, the medium was poured into Petri plates of 9 cm in diameter under aseptic conditions. Discs of culture medium with 1 cm in diameter containing the fungus mycelium were transferred to the center of each plate containing the treatments. Then, the plates were wrapped in plastic film and incubated for 7 days in a B.O.D incubator (Biochemical Oxygen Demand) at a temperature of $27\pm 2^{\circ}\text{C}$.

The mycelial growth was assessed through daily measurements of colony diameters with a graduated ruler. For each colony, a daily data comprised the average of two perpendicular measurements. With the result of the measures, we calculated the percentage of mycelial growth inhibition (PGI; [28]) and the index of mycelial growth speed (IMGS; [29]), according to the formulas (1) and (2):

$$PGI = \frac{[(negative\ control\ growth - treatment\ growth)] \times 100}{negative\ control\ growth} \quad (1)$$

$$IMGS = \sum \frac{current\ mycelial\ growth - previous\ mycelial\ growth}{number\ of\ days\ of\ incubation} \quad (2)$$

2.2 Statistical analysis of data

The effect of oils concentrations on fungi growth was investigated through linear and quadratic regressions. Since in some cases the R^2 value was very close between the two models, we used the Akaike Information Criterion (AIC) to decide which model best represented the relationship between the oil concentrations and fungus growth. Simply put, the lower the AIC value, the better the model. Only the best models were plotted in graphs. The significance of each term of the equations was assessed using the test T.

Hypothesis tests were performed to verify the significance of differences between the treatment with the highest concentration of oils (1%) and the treatments with fungicides (Thiram and Mancozeb). We used Kruskal-Wallis non-parametric tests followed by Wilcoxon's multiple comparisons because the data did not satisfy the normal probability distribution assumption of parametric tests. All analyzes were carried out in the R 3.5.1 software [30]. Differences with a probability value below 5% were considered significant.

3. RESULTS AND DISCUSSION

All concentrations of copaiba and eucalyptus oils reduced the mycelial growth of *Alternaria alternata* and *Colletotrichum musae* (Fig. 1). The highest concentrations (0.8 and 1.0%) provided the best growth inhibitions. At these concentrations, respectively, copaiba oil inhibited 31.4 and 33.7% of *A. alternata* and 46.9 and 49.6% of *C. musae*, while eucalyptus oil inhibited 52.6 and 79.6% of *A. alternata* and 66.3 and 41.2% of *C. musae*.

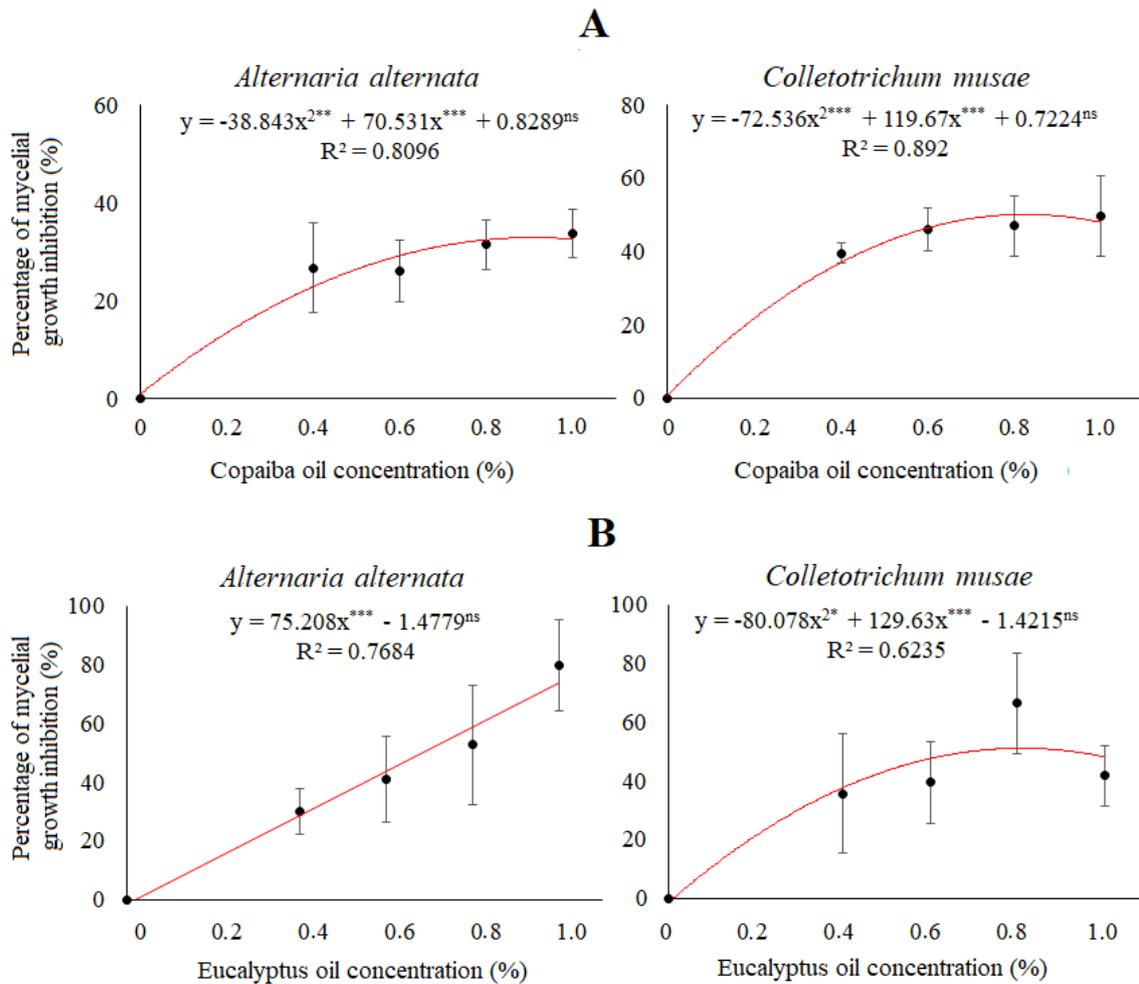


Fig. 1. A. Effect of different concentrations of copaiba essential oil on the percentage of inhibition of mycelial growth of *Alternaria alternata* and *Colletotrichum musae*. B. Effect of different concentrations of eucalyptus essential oil on the percentage of inhibition of mycelial growth of *Alternaria alternata* and *Colletotrichum musae*. The red line shows the direction of the effect estimated by the regression analysis.

* P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001; ns: No significant.

Copaiba oil: *Alternaria alternata* (F = 46.78, p = 1.191e-08); *Colletotrichum musae* (F = 90.82, p = 2.339e-11).

Eucalyptus oil: *Alternaria alternata* (F = 76.29, p = 9.205e-09); *Colletotrichum musae* (F = 18.22, p = 2.155e-05).

Comparing the same concentrations, the inhibitions caused by both oils against *A. alternata* and *C. musae* differed from the inhibitions caused on other fungi. For example, copaiba and eucalyptus oils have a low fungitoxic effect on the growth of *Macrophomina phaseolina*. Ugulino et al. [27] reported the maximum inhibitions of 33 and 21%, respectively. On the other hand, these oils exert moderate to high inhibition on the growth of *Colletotrichum gloeosporioides*. Sousa et al. [22], also using the copaiba and eucalyptus oils, found reductions of 50 and 100% on the growth of *C. gloeosporioides*.

Copaiba and eucalyptus oils exhibited a dose-dependent effect when tested in the control of *A. alternata* and *C. musae*, i.e., inhibition increased with the dosage used. Ugulino et al. [27], when testing the effect of copaiba oil on the control of *M. phaseolina*, obtained the opposite result to ours, the highest inhibition occurred in the lowest dose tested (0.4%), with higher mycelial growth at higher oil concentrations. Thus, the increase of inhibitory power as a function of oil concentration depends on the species of microorganism studied. In some organisms, increased concentration potentiates the inhibitory effect, in others; the effect be reduced, which generates waste of the product.

According to the regression results, the total inhibition reached only when using eucalyptus oil against *A. alternata* in a concentration of 1.31%. In the other cases, the modeling suggests that the oils are unable to inhibit 100% of mycelial growth. Therefore, we suggest that the maximum inhibition values obtained among the concentrations tested in the present study. The use concentrations higher than 1.0% on the control of *A. alternata* and *C. musae* would be economically unviable.

In contrast to our results, tests made with oil from different species of eucalyptus [21] or different parts of the same plant [31] showed increasing inhibition with the rising of concentrations. Therefore, several factors can affect the chemical composition of the oil, which in turn influences its biological activity. Some examples are the genetic factors of the plant [32], ecological factors surrounding the plant and edaphoclimatic conditions (climate, temperature and soil type) [33]. The crop techniques applied to the vegetal material used to obtain the oil also affect its chemical composition, such as the period of harvest, the preparation of the material before the extraction, and the part of the plant used in the production of oil [34].

In the present study, the copaiba oil caused only a moderate inhibition on the mycelial growth of both fungi because it did not reach 50% inhibition. The eucalyptus oil caused a high inhibition because it reduced 79.6% of the growth of *A. alternata* and 66.3% of *C. musae*. França et al. [35], when evaluating the effect of peppermint oil on the growth of *A. alternata*, also obtained moderate inhibition, since the highest concentrations, 0.8 and 1.0%, inhibited only 41.6 and 37.1%, respectively. Other vegetable oils showed superior results, for example, the essential oil of mandarin (*Citrus reticulata*) inhibited 84% of *A. alternata* growth in the concentration of 0.1 mL 100 mL⁻¹, while at 0.2 mL 100 mL⁻¹ the oil caused total inhibition [36].

The essential oil of *Lippia gracilis* promoted complete inhibition of *Alternaria* sp. growth in the concentration of 750 µL L⁻¹ [6]. The essential oil of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) had a minimum inhibitory concentration of 14.49 µg mL⁻¹ on the growth of *A. alternata* [37]. During *in vitro* tests to control *Colletotrichum musae*, the spiked pepper oil (*Piper aduncum*) inhibited 100% of mycelial growth and spore germination at concentrations of 100 µg mL⁻¹ and 150 µg mL⁻¹, while in the *in vivo* control of banana rot, the best inhibition obtained with the oil in the concentration of 1.0% [11].

The antifungal effect of tested oils was generally lower than the obtained by commercial fungicides (thiram and mancozeb) (Fig. 2). In the control of *A. alternata*, the inhibition caused by copaiba oil had a weaker effect compared to the fungicides, whereas the essential oil of eucalyptus in the highest concentration had the same effect of the mancozeb fungicide and a lower effect than thiram fungicide. In the control of *C. musae*, the fungal inhibition promoted by both oils in the highest concentration was inferior to the two fungicides.

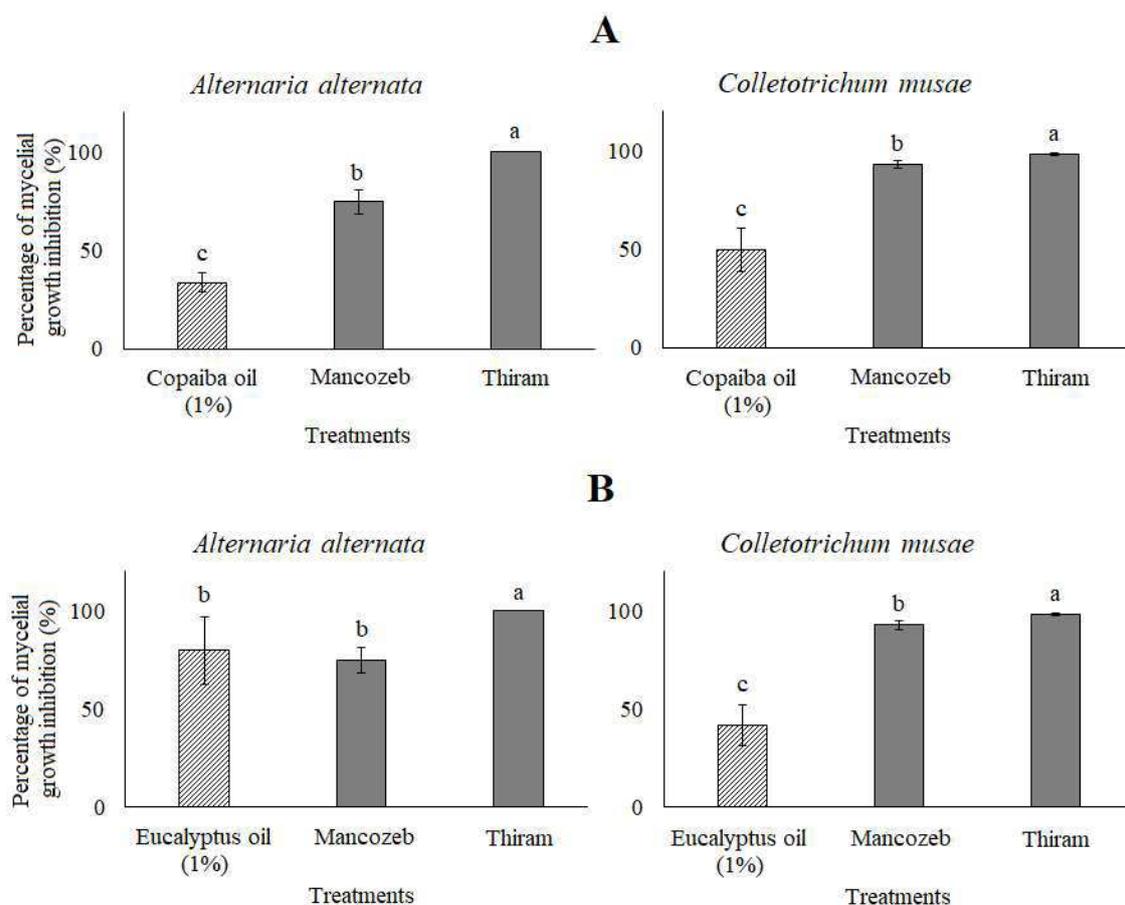


Fig. 2. A. Percentage inhibition of mycelial growth of *Alternaria alternata* and *Colletotrichum musae* in the highest tested concentration of copaiba essential oil and the positive control treatments. B. Percentage inhibition of mycelial growth of *Alternaria alternata* and *Colletotrichum musae* in the highest tested concentration of eucalyptus oil and the positive control treatments.

The mycelial growth speed of *A. alternata* and *C. musae* differed significantly between the concentrations of oils (Fig. 3). Treatments with concentrations of 0.8 and 1.0% reduced the growth rate of *A. alternata* for 0.44 and 0.43 cm dia⁻¹ using copaiba oil and 0.3 and 0.1 cm day⁻¹ using eucalyptus oil, both differing from the negative control, which had the highest growth rate (0.64 cm day⁻¹). Treatments at same concentrations above reduced the growth rate of *C. musae* to 0.62 and 0.59 cm day⁻¹ using copaiba oil and 0.41 and 0.69 cm dia⁻¹ using eucalyptus oil, both differing from the negative control (1.18 cm day⁻¹).

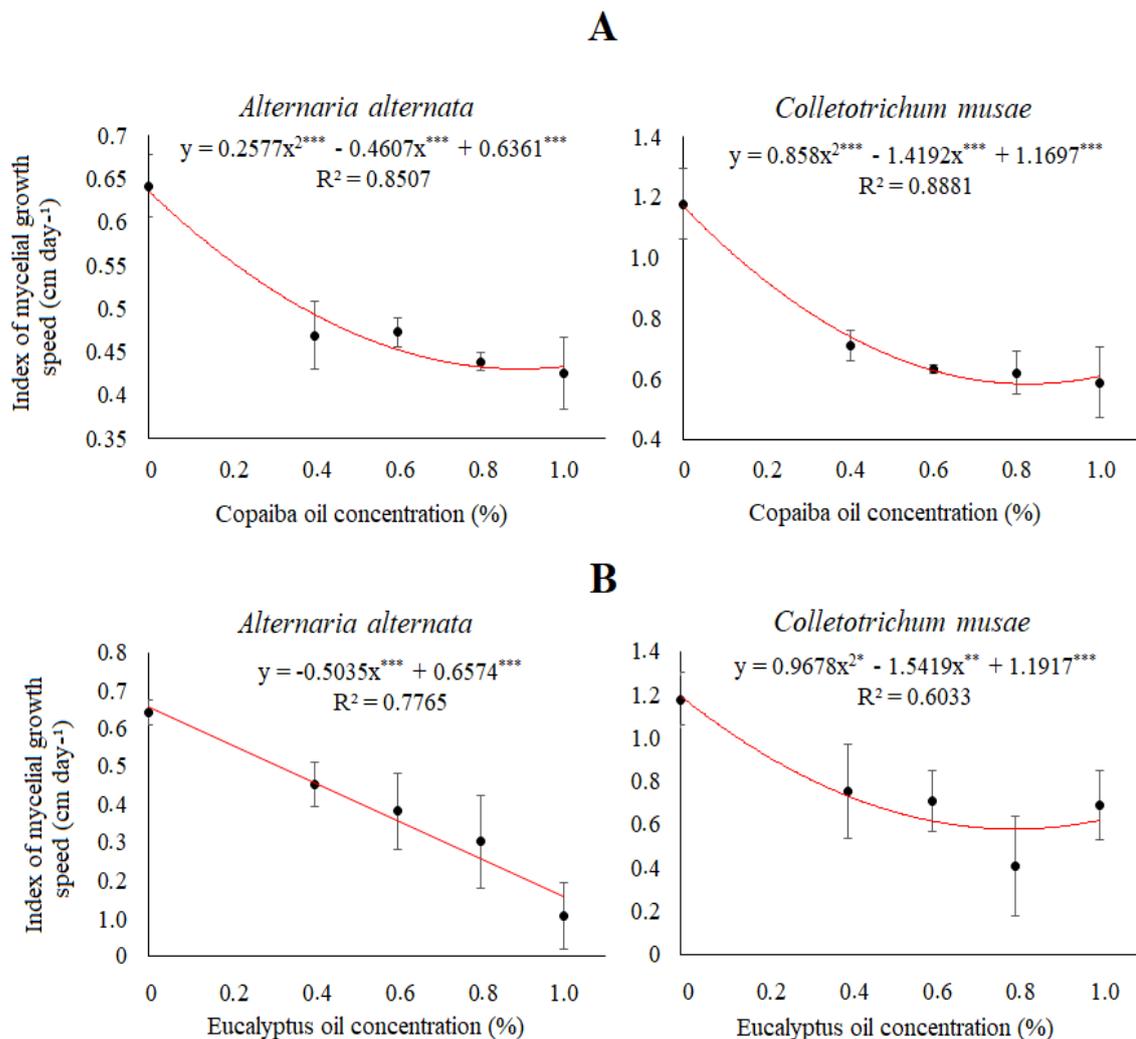


Fig. 3. A. Effect of different concentrations of copaiba essential oil on the index of mycelial growth speed of *Alternaria alternata* and *Colletotrichum musae*. B. Effect of different concentrations of eucalyptus essential oil on the index of mycelial growth speed of *Alternaria alternata* and *Colletotrichum musae*. The red line shows the direction of the effect estimated by the regression analysis.

*P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001.

Copaiba oil: *Alternaria alternata* (F = 62.66, p = 8.242e-10); *Colletotrichum musae* (F = 87.32, p = 3.439e-11).

Eucalyptus oil: *Alternaria alternata* (F = 79.89, p = 6.081e-09); *Colletotrichum musae* (F = 16.73, p = 3.828e-05).

The results obtained in the present study suggest the existence of biologically active compounds in the essential oils of copaiba and eucalyptus, which guaranteed an antifungal activity against *Alternaria alternata* and *Colletotrichum musae* under *in vitro* conditions. The low toxicity and the fast degradation in the environment give advantages to essential oils over the conventional agrochemical in phytopathogen control [38]. Also, the low cost of production and the reduction of risks to the health of producers and final consumers enhance the benefits of these products.

In this perspective, the results of this work provide information for the elaboration of natural products to agroecological crops aiming to reduce in the use of conventional fungicides. We suggest the study of *in vivo* control of *A. alternata* and *C. musae* to evaluate the activity of the oils on different plant species and to establish the safe inhibitory concentrations of these products.

4. CONCLUSION

The essential oils of copaiba (*Copaifera* sp.) and eucalyptus (*Eucalyptus* sp.) inhibit the growth of *Alternaria alternata* and *Colletotrichum musae* under *in vitro* conditions. Concentrations of 0.8 and 1.0% promoted the highest inhibitory effect.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

This work carried out in collaboration between all authors. Authors LPN and KRSF carried out the experiment, managed the analyses of the study, performed calculations, managed the literature searches, interpreted the results, wrote the first draft of the manuscript and finished the paper with the others authors suggestions. Author TLS, FMFA, AMS and ALNU helped in carrying out the experiment, with results interpretation, managing the analyses, discussion and writing the paper. Author TALC helped in designing the study, performed the statistical analysis, helped with the discussion, did the review of full paper and made the translation into English. Author APMR helped to carry out the experiment, helped write the results and discussion and reviewed the full paper. AFMJ designed the study, helped in carrying out the experiment, performed calculations and did the review of full paper. **All authors read and approved the final manuscript.**

REFERENCES

1. Adami ACO, Sousa EP, Fricks LB, Miranda SHG. Oferta de exportação de frutas do brasil: O caso da manga e do melão, no período de 2004 a 2015. Rev. Econ. 2016;47(4):63-78. Portuguese.
2. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Plano Nacional de Desenvolvimento da Fruticultura. Publicado em 27 de fevereiro de 2018. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/noticias/mapa-lanca-plano-de-fruticultura-em-parceria-com-o-setor-privado/PlanoNacionaldeDesenvolvimentodaFruticulturaMapa.pdf>>. [Portuguese]
3. Bueno G, Baccarin JG. Participação das principais frutas brasileiras no comércio internacional: 1997 a 2008. Rev. Bras. Frutic. 2012;34(2):424-34. Portuguese.
4. Nascimento FV, Santos MC, Valdebrito-Sanhueza RM, Bartnicki VA. Hidrotermia e radiação UV-C no controle de patógenos de manga e melão. Summa Phytopathol. 2014;40(4):313-17. Portuguese.
5. Camargo RB, Peixoto AR, Terao D, Ono EO, Cavalcanti SLS. Fungos causadores de podridões pós-colheita em uvas apirênicas no pólo agrícola de Juazeiro-BA e Petrolina-PE. Revista caatinga. 2011;24(1):15-9. Portuguese.
6. Barboza HS. Efeito fungitóxico do óleo essencial de alecrim-da-chapada em *Alternaria* sp. 2015. 31fls. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Agronomia) – Universidade Federal do Semi-Árido, Mossoró. 2015. Portuguese.
7. Azevedo FA, Polydoro DA, Bastianel M, Kupper KC, Stuart RM, Costa FP, Pio RM. Resposta de diferentes genótipos de tangerinas e seus híbridos à inoculação *in vitro* e *in vivo* de *Alternaria alternata*. Revista Brasileira de Fruticultura. 2010;32:1-8. Portuguese.
8. Droby S, Prusky D. Induction of antifungal resorcinols in flesh of unripe mango fruits and its relation to latent infection by *Alternaria alternata*. Physiological and Molecular Plant Pathology. 1987;30:285-92.
9. Griffe PJ. Resistance to benomyl and related fungicides in *Colletotrichum musae*. Trans. Br. mycol. Soc. 1973;60(3):433-39.

10. Wilson MR, Gallimore WA, Reese PB. Steroid transformations with *Fusarium oxysporum* var. *cubense* and *Colletotrichum musae*. *Steroids*. 1999;64:834-43.
11. Bastos CN, Albuquerque PSB. Efeito do óleo de *Piper aduncum* no controle em pós-colheita de *Colletotrichum musae* em banana. *Fitopatol. Bras.* 2004;29(5):555-57. Portuguese.
12. Bonett LP, Hurmann ES, Pozza-Júnior MB, Rosa TB. Biocontrole *in vitro* de *Colletotrichum musae* por Isolados de *Trichoderma* spp. *Uniciências*. 2013;17(1):5-10. Portuguese.
13. Faria NMX, Fassa AG, Facchini LA. Intoxicação por agrotóxicos no Brasil: Os sistemas oficiais de informação e desafios para a realização de estudos epidemiológicos. *Ciência e Saúde coletiva*. 2007;12(1):25-38. Portuguese.
14. Rigotto RM, Da Silva AMC, Ferreira MJM, Rosa IF, Aguiar ACP. Tendências de agravos crônicos à saúde associados a agrotóxicos em região de fruticultura no Ceará, Brasil. *Revista Brasileira de Epidemiologia*. 2013;16(3):763-73. Portuguese.
15. Silva AC, Souza PE, Resende MLV, Silva Jr MB, Ribeiro Jr PM, Zeviani WM. Local and systemic control of powdery mildew in eucalyptus using essential oils and decoctions from traditional Brazilian medicinal plants. *Forest Pathology*. 2014;44:145-53.
16. Marinho AMCP. Contextos e contornos da modernização agrícola em municípios do Baixo Jaguaribe – CE: o espelho do (des)envolvimento e seus reflexos na saúde, trabalho e ambiente. [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP. 2010. Portuguese.
17. Bandoni AL and Czepak MP. Os recursos vegetais aromáticos no Brasil. Vitória: Edufes, 2008. 624p. Portuguese.
18. Carmo ES, Lima EO, Souza EL. The potential of *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) essential oil in inhibiting the growth of some food-related *Aspergillus* species. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2008;39(2):362-67.
19. Silva WJ, Dória GAA, Maia RT, Nunes RS, Carvalho GA, Blank AF, Alves PB, Marça IR, Cavalcanti SCH. Effects of essential oils on *Aedes aegypti* larvae: Alternatives to environmentally safe insecticides. *Bioresource Technology*. 2008;99:3251-55.
20. Nascimento SMC, Carvalho EA, Warwick DRN, Palheta JG, Dos Santos TPF. Inibição do crescimento micelial de *Thielaviopsis paradoxa* por óleos vegetais. In: ENCONTRO AMAZÔNICO DE AGRÁRIAS, 5., 2013, Belém, PA. A importância da tecnologia e do empreendedorismo no desenvolvimento amazônico. Belém, PA: UFRA, 2013:1-5.
21. Salgado APS, Cardoso MG, Souza PE, Souza JA, Abreu CMP, Pinto JEBP. Avaliação da atividade fungitóxica de óleos essenciais de folhas de *Eucalyptus* sobre *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* e *Bipolaris sorokiniana*. *Ciência Agrotécnica*. 2003;27(2):249-54. Portuguese.
22. Sousa RMS, Serra IMRS, Melo TA. Efeito de óleos essenciais como alternativa no controle de *Colletotrichum gloeosporioides*, em pimenta. *Summa Phytopathologica*. 2012;38(1):42-7. Portuguese.
23. Deus RJA, Alves CN, Arruda MSP. Avaliação do efeito antifúngico do óleo resina e do óleo essencial de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne). *Rev. Bras. Pl. Med.* 2011;13(1):1-7.
24. Sobral MF, Carnauba JP, Silva JC, Amorim EPR. Efeito *in vitro* de óleos de andiroba e copaíba no crescimento micelial de *Scytalidium lignicola*. *Fitopatologia Brasileira*. 2006;31: 12. Portuguese.
25. Antunes MDC and Cavacob A. The use of essential oils for postharvest decay control. A review. *Flavour Fragrance Journal*. 2010;25:351-66.
26. Tyagi AK and Malik A. Antimicrobial potential and chemical composition of *Eucalyptus globulus* oil in liquid and vapour phase against food spoilage microorganisms. *Food Chemistry*. 2011;126:228-35.

27. Ugulino ALN, Mendonça Júnior AF, Rodrigues APM, Santos AB, França KRS, Cardoso, TAL and Prado Júnior LD. Inhibition Effect of Vegetable Oils on the Mycelial Growth of *Macrophomina phaseolina* (Tassi.). *Goid. Journal of Agricultural Science*. 2018;10(6):49-56.
28. Bastos CN. Efeito do óleo de *Piper aduncum* sobre *Crinipellis* e outros fungos fitopatogênicos. *Fitopatologia Brasileira*. 1997;22(3):441-43. Portuguese.
29. Oliveira JA. Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativas* L.) e pimentão (*Capsicum annuum* L.). 1991. 111 f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, 1991. Portuguese.
30. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria; 2018. Available: <https://www.R-project.org/>
31. Dawar S, Younus SM, Tariq M and Zaki J. Use of *Eucalyptus* sp., in the control of root infecting fungi on mung bean and chick pea. *Pak. J. Bot.* 2007;39(3):975-79.
32. Morais LAS. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. *Horticultura brasileira*. 2009;27(2):4050-63. Portuguese.
33. Andrade MA, Das Graças CM, Batista LR, Mallet ACT, Machado, SMF. Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: Composição, atividades antioxidante e antibacteriana. *Revista Ciência Agronômica*. 2012;43(2):399-408. Portuguese.
34. Maia TF, Donato A, Fraga ME. Atividade antifúngica de óleos essenciais de plantas. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*. 2015;17(1):105-16. Portuguese.
35. França KRS, Silva TL, Cardoso TAL, Ugulino ALN, Rodrigues APM, Mendonça Júnior AF. *In vitro* effect of essential oil of peppermint (*Mentha x piperita* L.) on the mycelial growth of *Alternaria alternata*. *Journal of Experimental Agriculture International*. 2018;26(5):1-7.
36. Chutia M, Deka Bhuyan P, Pathak MG, Sarma TC, Boruah P. Antifungal activity and chemical composition of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against phytopathogens from North East India. *LWT - Food Science and Technology*. 2009;42:777-80.
37. Guimarães LGL, Cardoso MG, De Sousa PE, De Andrade J, Vieira SS. Atividades antioxidante e fungitóxica do óleo essencial de capim-limão e do citral. *Revista Ciência Agronômica*. 2011;42(2):464-72. Portuguese.
38. Coimbra JL, Soares ACF, Garrido MDS, Sousa CDS and Ribeiro FLB. Toxicity of plant extracts to *Scutellonema bradys*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 2006;41(7):1209-11.