

LUCIANE CRISTINA ROZWALKA

**CONTROLE ALTERNATIVO DA ANTRACNOSE
EM FRUTOS DE GOIABEIRA, EM LABORATÓRIO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal, linha de pesquisa de Manejo em Fitossanidade e Impacto Ambiental, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientadora: Dra. Maria Lúcia Rosa
Zaksevskas da Costa Lima

Co-Orientadora: Dra. Louise Larissa May de
Mio

CURITIBA

2003

AGRADECIMENTOS

À professora Maria Lúcia Rosa Zaksevskas da Costa Lima, pelo privilégio de tê-la como minha orientadora. Pessoa de caráter inestimável, exemplo de força e perseverança, que traz consigo um coração infinitamente bondoso e que muito me ensinou.

Às professoras Louise Larissa May de Mio e Tomoe Nakashima, pela co-orientação, apoio, incentivo, amizade e pelos conselhos que me fortaleceram, estimularam e incutiram mais confiança no meu desempenho.

Ao professor Vismar da Costa Lima Neto pela aquisição da Bolsa do CNPq, permitindo assim minha permanência no Curso.

Ao professor Henrique Soares Koehler, pela compreensão e incentivo.

Aos professores integrantes da Banca Examinadora de Pré-defesa e Defesa.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação pelo compartilhamento do saber.

Aos funcionários do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo pelos serviços prestados, amizade e incentivo Cléia, Célia, Gilson, Gregório, Maria Emília, Regina e Seu Zé.

A todos os amigos da Pós-Graduação, em especial, Luciene Martins Moreira, Márcia Bello, Lucimara Antunes, Maria de Lurdes Wos, Pryscilla Gaertner, minhas amigas de todas as horas, principalmente das mais difíceis.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal, em especial aos professores Luiz Antonio Biasi e Luiz Doni Filho, pela oportunidade de realizar este trabalho.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa, possibilitando a dedicação exclusiva para o desenvolvimento desse trabalho.

A Deus por Sua Sabedoria e bênçãos concedidas,
Permitindo que caminhemos sempre na Sua Verdade...

AGRADEÇO

Aos meus pais Vani e Reinaldo...
Aos meus irmãos Marcelo e Rodrigo,
À minha cunhada Edna,
Pelo apoio, compreensão e paciência...

OFEREÇO

Ao Pedro, meu sobrinho, em especial...
Ao Allan, Ivan, Leonardo e Leonardo, Giovanna e Gabriel e
à todas as crianças que pela alegria, pureza e simplicidade,
propiciam na minha vida, dias mais felizes e repletos de esperança...

DEDICO

Você vê as coisas e diz:

“Por quê?”

Mas eu sonho com as coisas que nunca existiram e digo:

“Por que não?”

George Bernard Shaw

BIOGRAFIA DO AUTOR

LUCIANE CRISTINA ROZWALKA, nascida em Curitiba.

Cursou o primeiro grau no Colégio Erasto Gaertner, e o segundo grau no Centro Federal de Educação Tecnológica do Paraná, obtendo a qualificação de Técnico em Desenho Industrial, e em 1996 recebeu o grau de Engenheira Agrônoma, conferido pela Universidade Federal do Paraná.

De 1998 a 1999, trabalhou em empresa particular na produção de mudas de batata-semente via micropropagação.

Em março de 2001, iniciou o Curso de Mestrado em Curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal, linha de pesquisa de Manejo em Fitossanidade e Impacto Ambiental, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 A FRUTICULTURA NO BRASIL	3
2.2 A GOIABEIRA (<i>Psidium guajava</i> L.)	4
2.3 IMPORTÂNCIA ALIMENTAR, ECONÔMICA E SOCIAL	5
2.4 PRODUÇÃO INTEGRADA DE FRUTAS PIF	6
2.5 PROGRAMA BRASILEIRO PARA MELHORIA DOS PADRÕES COMERCIAIS E EMBALAGENS DE HORTIGRANJEIROS	7
2.5.1 Programa Paranaense Para Melhoria Dos Padrões Comerciais E Embalagens De Frutas Hortiqualidade-PR	8
2.5.2 Proposta Referente À Classificação Da Goiaba Para O Programa Brasileiro Para A Melhoria Dos Padrões Comerciais E Embalagens De Hortigranjeiros	9
2.6 ANTRACNOSE EM FRUTOS DE GOIABEIRA (<i>Psidium guajava</i> L.)	10
2.7 O PATÓGENO <i>Glomerella cingulata</i> (<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> Penzig)	11
2.8 CONTROLE ALTERNATIVO	13
3 MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 OBTENÇÃO DE ISOLADOS DO PATÓGENO <i>Glomerella cingulata</i> (<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>)	17
3.2 DIFERENCIAÇÃO DOS ISOLADOS: CRESCIMENTO MICELIAL, PATOGENICIDADE E ESPECIFICIDADE	17
3.3 CONTROLE ALTERNATIVO DE <i>Glomerella cingulata</i> e <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , <i>in vitro</i>	18
3.3.1 Seleção de plantas medicinais	18

3.3.2	Potencial de inibição de extratos aquosos sobre o crescimento micelial de <i>Glomerella cingulata</i> e <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , <i>in vitro</i>	19
3.3.2.1	Preparo do extrato aquoso	19
3.3.3	Potencial de inibição de óleos essenciais sobre o crescimento de <i>Glomerella cingulata</i> e <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , <i>in vitro</i>	20
3.3.3.1	Extração de óleos essenciais	20
3.3.3.2	Potencial de inibição dos decoctos sobre o crescimento micelial de <i>Glomerella cingulata</i> e <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , <i>in vitro</i>	22
3.4	CONTROLE DE <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> EM FRUTOS DE GOIABEIRA	23
3.5	GERMINAÇÃO E FORMAÇÃO DE APRESSÓRIO DE <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> EM MEMBRANA DE POLIESTIRENO	24
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4.1	OBTENÇÃO DE ISOLADOS DO PATÓGENO <i>Glomerella cingulata</i> (<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>)	25
3.2	DIFERENCIAÇÃO DOS ISOLADOS: CRESCIMENTO MICELIAL, PATOGENICIDADE E ESPECIFICIDADE	26
4.3	CONTROLE ALTERNATIVO DE <i>Glomerella cingulata</i> e <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , <i>in vitro</i>	27
4.3.1	Potencial de inibição de extratos aquosos sobre o crescimento micelial de <i>Glomerella cingulata</i> e <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , <i>in vitro</i>	27
4.3.2	Potencial de inibição de óleos essenciais sobre o crescimento de <i>Glomerella cingulata</i> e <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , <i>in vitro</i>	30
4.4.3	Potencial de inibição dos decoctos sobre o crescimento micelial de <i>Glomerella cingulata</i> e <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , <i>in vitro</i>	34
4.4	CONTROLE DE <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> EM FRUTOS DE GOIABEIRA	35
4.5	GERMINAÇÃO E FORMAÇÃO DE APRESSÓRIO DE <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> EM MEMBRANA DE POLIESTIRENO	39
5	CONCLUSÃO	40
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	41
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	- Plantas medicinais selecionadas para a avaliação do potencial de inibição e/ou ação fungicida sobre o crescimento micelial de <i>Glomerella cingulata</i> e <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	19
TABELA 2	- Relação de plantas medicinais e os órgãos vegetais empregados para a extração de óleos essenciais	22
TABELA 3	- Produtos utilizados na avaliação do potencial de inibição do patógeno <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , <i>in vivo</i>	24
TABELA 4	- Isolados do patógeno <i>Glomerella cingulata</i> (<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>) obtidos a partir de frutos de goiabeira (<i>Psidium guajava</i> L.), cultivares Iwao ou Carlópolis (polpa branca) e Paluma (polpa vermelha)	25
TABELA 5	- Avaliação do crescimento micelial, em meio BDA, de <i>Glomerella cingulata</i> (<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>), <i>in vitro</i>	26
TABELA 6	- Crescimento micelial de <i>Glomerella cingulata</i> e <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , <i>in vitro</i> , em meio BDA, contendo extratos aquosos a 10%.....	28
TABELA 7	- Crescimento micelial de <i>Glomerella cingulata</i> em presença de óleos essenciais, <i>in vitro</i>	32
TABELA 8	- Crescimento micelial de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> em presença de óleos essenciais, <i>in vitro</i>	32
TABELA 9	- Crescimento micelial de <i>Glomerella cingulata</i> e <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , <i>in vitro</i> , em meio BDA, contendo decoctos	35
TABELA 10	- Incidência de antracnose, em ferimentos em goiabas variedade Paluma (polpa vermelha), tratados em pós-colheita	37
TABELA 11	- Incidência de antracnose, em ferimentos em goiabas variedade Iwao (polpa branca), tratados em pós-colheita	37

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	- Acérvulos do patógeno <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> na epiderme do fruto da goiabeira por microscopia eletrônica de varredura	12
FIGURA 2	- Desorganização a nível celular promovida pelo patógeno <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	12
FIGURA 3	- Aparelho de CLEVINGER	21
FIGURA 4	- Porcentagem de inibição do crescimento micelial de <i>Glomerella cingulata</i> , <i>in vitro</i> , em meio BDA contendo extratos aquosos de plantas medicinais a 10%	29
FIGURA 5	- Porcentagem de inibição do crescimento micelial de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , <i>in vitro</i> , em meio BDA contendo extratos aquosos a 10%	29
FIGURA 6	- Porcentagem de inibição do crescimento micelial de <i>Glomerella cingulata</i> na presença de óleos essenciais em meio BDA, <i>in vitro</i>	33
FIGURA 7	- Porcentagem de inibição do crescimento micelial de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> na presença de óleos essenciais em meio BDA, <i>in vitro</i>	33
FIGURA 8	- Alteração fisiológica decorrente da utilização de óleos essenciais	39

RESUMO

A antracnose ou mancha-chocolate é considerada uma das doenças mais graves em pós-colheita na cultura da goiabeira (*Psidium guajava* L.), podendo vir a ser juntamente com o resíduo de produtos químicos um entrave para exportação. Embora, o controle químico de doenças de plantas, seja considerado em muitos casos, a única medida eficiente e economicamente viável de garantir produtividade e qualidade visadas pela agricultura moderna, o uso contínuo pode promover a seleção de fungos patogênicos resistentes. Desta forma, a busca de métodos de controle alternativo, como a exploração da atividade biológica de compostos secundários presentes em plantas medicinais e a indução de resistência, torna-se necessária para atender as normas de qualidade do mercado externo, principalmente em relação à extinção e/ou substituição do uso de produtos químicos (agrotóxicos) por produtos biológicos ou fitorreguladores. O presente trabalho teve como objetivo geral, a avaliação do potencial de plantas medicinais (*in vitro*) e adubos foliares e ativadores de plantas (*in vivo*) como método de controle alternativo do patógeno *Glomerella cingulata* (*Colletotrichum gloeosporioides*). Os experimentos foram realizados no Laboratório de Fitopatologia, do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, no Setor de Ciências Agrárias da UFPR, Curitiba/PR. As plantas medicinais, avaliadas quanto ao potencial de inibição do crescimento micelial e germinação de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides*, na forma de extratos aquosos foram: alecrim (*Rosmarinus officinalis*), alfavaca (*Ocimum basilicum*), bardana (*Articum lappa A. minus*), calêndula (*Calendula officinalis*), camomila (*Chamomila recutita*), capim-limão (*Cymbopogon citrates*), cavalinha (*Equisetum sp*), cravo-da-Índia (*Syzygium aromaticum*), espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*), funcho (*Foeniculum vulgare*), gengibre (*Zingiber officinale*), goiaba (*Psidium guajava*), hortelã (*Mentha piperita*), lípia (*Lippia Alba*), quebra-pedra (*Phyllanthus sp*), sabugueiro (*Sambucus nigra*), tansagem (*Pantago australis, P. major*) e tagetes (*Tagetes minuta*) e na forma de óleos essenciais: alecrim, alfavaca, calêndula, camomila, capim-limão, cravo, funcho, gengibre, goiaba, laranja (*Citrus sinensis*), lípia, macela (*Achrylocline satureioides*), e tagetes. O extrato e o óleo essencial cravo-da-Índia inibiu em 100% o crescimento micelial de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides*, e a germinação de *Colletotrichum gloeosporioides*, *in vitro*. O óleo essencial de capim-limão inibiu em 62,8% o crescimento micelial de *Glomerella cingulata* e, em 100% *Colletotrichum gloeosporioides*. Os óleos essenciais de alfavaca, funcho e gengibre apresentaram percentual de inibição de *Colletotrichum gloeosporioides* superior a 50%. O extrato aquoso de alecrim inibiu o crescimento micelial de *Glomerella cingulata* em 67%. O extrato de bardana favoreceu o crescimento micelial de ambas as formas do patógeno, da mesma forma os extratos aquosos de hortelã e sabugueiro favoreceram o crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*. No controle alternativo em frutos de goiabeira, da variedade Paluma (polpa vermelha), o extrato de cravo a 2,5% apresentou-se como o tratamento mais eficiente, estatisticamente. Os óleos essenciais de cravo e capim-limão, pela volatilização e concentração, provocaram alterações fisiológicas na casca. A inibição total ou parcial do crescimento micelial de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides*, observada *in vitro*, pelos extratos aquosos e óleos essenciais obtidos a partir de plantas medicinais, indica a existência de compostos com ação fungitóxica possibilitando o emprego destas no controle alternativo da antracnose em frutos de goiabeira.

Palavras-chave: *Glomerella cingulata*, *Colletotrichum gloeosporioides*, crescimento micelial, extrato aquoso, óleos essenciais, plantas medicinais.

Título: CONTROLE ALTERNATIVO DA ANTRACNOSE EM FRUTOS DA GOIABEIRA, EM LABORATÓRIO

ABSTRACT

The antracnose or chocolate-stain is considered one of the most serious diseases in post-harvesting of the guava culture (*Psidium guajava* L.), that can come to be, together with the chemical products residues an obstacle for exportation. Although, the chemical control of diseases of plants be considered, in many cases, the only efficient and economically viable measurement of guaranteeing productivity and quality sought by the modern agriculture, the continuous use can promote the selection of fungus pathogens resistant. This way, the search for methods of alternative control, as the biological activity exploration of having secondary compounds presents in medicinal plants and the resistance induction, becomes necessary to assist the norms of quality of the external market, mainly in relation to the extinction and/or substitution of the use of chemical products (toxic agriculture products) for biological products or phytochemicals. The present work had as general objective, the evaluation of the potential of medicinal plants, leaf fertilizers and activators of plants as method of alternative control of the pathogen *Glomerella cingulata* (*Colletotrichum gloeosporioides*) effector of the antracnose in guava fruits (*Psidium guajava* L.). The experiments were accomplished in the Phytopathological Laboratory, of the Department of Fitotecnia and Fitossanitarismo, in the Section of Agrarian Sciences of UFPR, Curitiba/PR. In the alternative control of *Glomerella cingulata* and *Colletotrichum gloeosporioides*, in vitro, the medicinal plants were appraised with relationship to the potential of inhibition of the micelial and germination growth, in the form of aqueous extracts: rosemary (*Rosmarinus officinalis*), basil (*Ocimum basilicum*), burdock (*Articum lappa*, *A. minus*), calendula (*Calendula officinalis*), chamomile (*Chamomila recutita*), lemon grass (*Cymbopogon citrates*), cavalinha (*Equisetum* sp), clove (*Syzygium aromaticum*), espinheira-saint (*Maytenus ilicifolia*), fennel (*Foeniculum vulgare*), ginger (*Zingiber officinale*), guava (*Psidium guajava*), mint (*Mentha piperita*), lípia (*Lippia Alba*), break-stone (*Phyllanthus* sp), elderberry (*Sambucus nigra*), tansagem (*Pantago australis*, *P. major*) and tagetes (*Tagetes minuta*), and in the form of oils essences: rosemary, basil, calendula, chamomile, lemon grass, clove, fennel, ginger, guava, orange (*Citrus sinensis*), lípia, mayweed (*Achryocline satureioides*) and tagetes. The clove, in the extract forms and essential oil, came as a potential product in the inhibition of the development of the pathogen inhibiting in 100% the micelial growth of *Glomerella cingulata* and *Colletotrichum gloeosporioides*, and the germination of *Colletotrichum gloeosporioides*, in vitro. The lemon grass was shown as efficient controlling in 62,8% the micelial growth of *Glomerella cingulata* and, in 100% of *Colletotrichum gloeosporioides*. The essential oils of basil, fennel and ginger presented percentile of inhibition of *Colletotrichum gloeosporioides* higher at 50%. The aqueous extract of alecrim inhibited the micelial growth of *Glomerella cingulata* in 67%. The burdock extract favored the micelial growth in both ways of the pathogen, in the same way the aqueous extracts of mint and elderberry favored the micelial growth of *Colletotrichum gloeosporioides*. In the alternative control in guava fruits, of the variety Paluma (red pulp), the clove extract at 2,5% came as the most statistically efficient treatment. The essential oils of clove and lemon grass for the volatilization of some compounds or contact with the fruits provoked physiologic alterations in the peel. The total or partial inhibition of the micelial growth of *Glomerella cingulata* and *Colletotrichum gloeosporioides*, observed in vitro, for the aqueous extracts and essential oils obtained from medicinal plants, indicates the existence of compounds with fungicides action that will facilitate the employment of these in the alternative control of the antracnose in guava fruits.

Key words: *Glomerella cingulata*, *Colletotrichum gloeosporioides*, micelial growth, aqueous extract, essential oils, medicinal plants.

Title: ALTERNATIVE CONTROL OF ANTRACNOSE OF GUAVA FRUITS, IN LABORATORY

1 INTRODUÇÃO

A qualidade certificada de frutas passou a ser uma exigência dos mercados importadores que através de programas e legislações específicas realizam o controle e a fiscalização permanente de toda cadeia produtiva no país exportador (Naka, 2001), visando a segurança alimentar e proteção ambiental, pela extinção e/ou substituição do uso de produtos químicos (agrotóxicos) por produtos biológicos ou fitorreguladores.

Para consolidar os padrões de qualidade e competitividade e estabelecer uma referência mundial para o produto brasileiro, o Governo Federal lançou o PROGRAMA DE DESENVOLVIMENTO DA FRUTICULTURA – PROFRUTA, coordenado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, sendo o sistema de Produção Integrada de Frutas parte do conteúdo deste programa. No sentido de divulgar a fruticultura tropical nos países de clima predominantemente temperado, estabelecendo uma referência mundial para o produto brasileiro e fortalecendo as características positivas da fruta nacional nos principais mercados consumidores foi criada a marca “Brazilian Fruit” (<http://www.sebraemg.com.br/arquivos/programaseprojetos/agronegocios/Fruticultura/Cap4.doc>). No contexto mundial, o selo de qualidade para produtos agropecuários torna-se imprescindível para transações comerciais, dando credibilidade para produtores e confiança para consumidores. Países importadores não aceitam produtos que não tenham garantia de qualidade, sendo o selo, fundamental e restritivo (Hatschbach, 2000). Outra ação concreta é caracterizada pelo Programa Brasileiro Para a Melhoria Dos Padrões Comerciais e Embalagens De Hortigranjeiros, uma proposta referente à classificação de frutas.

Observações realizadas em locais destinados à comercialização de frutas e hortaliças incitam preocupação fundamental, em relação às perdas significativas decorrentes de podridões patológicas, que se refletem na redução do período de comercialização, desclassificação e descarte de produtos, comprometendo o aspecto econômico das culturas, ainda que, seja exacerbada e indiscriminada a utilização de produtos químicos (fungicidas). Além de que o uso contínuo pode promover a seleção de fungos patogênicos resistentes (Ghini & Kimati, 2002). No entanto, o controle químico de doenças de plantas, é considerado em muitos casos, a única medida eficiente e economicamente viável de garantir produtividade e qualidade visadas pela agricultura moderna (Kimati, 1995).

Na cultura da goiabeira, a antracnose ou mancha-chocolate é considerada uma das doenças mais graves em pós-colheita (FRUPEX, 1996), podendo vir a ser juntamente com o resíduo de produtos químicos um entrave para exportação.

Diante desta realidade, uma possibilidade baseia-se na pesquisa de métodos de controle alternativos, como a exploração da atividade biológica de compostos secundários presentes em plantas medicinais e a indução de resistência.

Fundamenta-se, assim, a seguinte hipótese: se os compostos naturais biologicamente ativos, existentes em plantas medicinais e/ou adubos foliares e ativadores de plantas, causarem a inibição do desenvolvimento do patógeno *Glomerella cingulata* (*Colletotrichum gloeosporioides*) ou induzirem a resistência, então estas plantas, adubos e ativadores serão empregados com eficiência no controle alternativo da antracnose em frutos de goiabeira.

O presente trabalho teve como objetivo geral, a avaliação do potencial de plantas medicinais, adubos foliares e ativadores de plantas como método de controle alternativo do patógeno *Glomerella cingulata* (*Colletotrichum gloeosporioides*) causador da antracnose em frutos de goiabeira (*Psidium guajava* L.), *in vitro* e *in vivo*.

Os objetivos específicos propiciaram a realização deste trabalho, por meio do isolamento do patógeno *Glomerella cingulata* (*Colletotrichum gloeosporioides*), screening (seleção) plantas medicinais sob a forma de extrato aquoso, *in vitro*, com potencial de inibição sobre o crescimento micelial de *Glomerella cingulata* (*Colletotrichum gloeosporioides*) e esporulação de *Colletotrichum gloeosporioides*, avaliação do potencial de inibição de plantas medicinais sob a forma de óleos essenciais, *in vitro*, sobre o crescimento micelial de *Glomerella cingulata* (*Colletotrichum gloeosporioides*) e esporulação de *Colletotrichum gloeosporioides*, avaliação de germinação e formação de apressório do patógeno *Colletotrichum gloeosporioides* e avaliação de adubos foliares e ativadores de plantas e dos melhores controles de extratos aquosos e de óleos essenciais, *in vivo*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A FRUTICULTURA NO BRASIL

A cadeia produtiva de frutas no Brasil abrange 2,2 milhões de hectares, gerando 4 milhões de empregos diretos com a demanda de mão-de-obra de 2 a 5 pessoas por hectare, fixando o homem no campo e um PIB agrícola de 11 bilhões. As transações externas brasileiras de frutas frescas caracterizam-se pela exportação de frutas tropicais e pela importação de frutas de clima temperado que apresentam pequena produção no País, com exceção da maçã. Embora seja o terceiro maior produtor do mundo, o Brasil é ainda um país marginal no comércio mundial de frutas frescas, sendo que do total produzido apenas 1% destina-se à exportação (Europa 63% e Mercosul 18%), 46% para indústria e 53% para o mercado interno (Almeida, 2002).

Dentre os fatores que contribuem para a reduzida inserção dos produtos tropicais no mercado de frutas frescas, destacam-se o baixo padrão de qualidade das frutas sob o enfoque de exigências internacionais de um mercado importador concentrado e exigente protegido por barreiras fitossanitárias, o pouco conhecimento das frutas de clima tropical, o uso inadequado de agrotóxicos e tecnologia de pós-colheita deficiente (Almeida, 2002).

Nos últimos dez anos, o consumo domiciliar no Brasil encolheu de 47,98 kg para 40,39 kg per capita, com redução de 16%. Nos Estados Unidos, ao contrário, houve crescimento de 22% no consumo (Gutierrez, 2000). O mercado doméstico, apesar do baixo indicador de consumo per capita, absorve mais da metade da produção nacional a um preço médio considerado excessivamente elevado para a qualidade das frutas colocadas à disposição do consumidor, gerando desestímulo adicional à participação nos mercados externos

(<http://www.sebraemg.com.br/arquivos/programaseprojetos/agronegocios/Fruticultura/Cap4.doc>).

O aumento da demanda no período de entressafra dos países do Hemisfério Norte, e o surgimento de nichos de mercado para a fruticultura tropical (mamão, manga, e laranja) e de espécies exóticas (goiaba) geram oportunidades para a inserção e incremento da participação do Brasil no mercado externo.

A exportação brasileira de frutas totalizou US\$ 369.181.649,00 em 2000, sendo mais

expressivas a manga (35.762.655,00), o melão (25.004.970,00), o mamão (17.694.482,00), a laranja (15.247.625,00), a uva (14.604.702,00), a banana (12.359.117,00) e a maçã (30.756.877,00). Manga e goiaba são classificadas em conjunto para efeito de divulgação de estatísticas por parte da Secretaria de Comércio Exterior do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio (SECEX/MDIC, 2001). Entretanto, as vendas externas de manga superam as de goiaba, que por ser considerada exótica e não contar com um programa eficiente de divulgação tem mercado restrito no exterior (<http://www.sebraemg.com.br/arquivos/programaseprojetos/agronegocios/Fruticultura/Cap4.doc>).

O Brasil cultiva, segundo dados de 1998 do IBGE, cerca de 13,4 mil hectares de goiaba e produz em torno de 300 mil toneladas, sendo um dos principais produtores mundiais. Esta produção está concentrada nos Estados de São Paulo, Pernambuco e Bahia que juntos respondem por mais de 80% do volume produzido no país. O mercado interno absorve quase que a totalidade da produção nacional, que vem aumentando em volumes colheita (FrutiSéries). No Brasil, um dos maiores produtores mundiais de goiaba, destaca-se a produção paulista com 60% da produção nacional, com mais de um milhão de pés de goiaba que ocupam 2,7 mil hectares, produzindo 51 mil toneladas ano e empregando 3812 pessoas. Os principais municípios produtores são Mirandópolis (32%) e Valinhos (16%). Maior produtor e consumidor, o Estado de São Paulo é o centro de origem (95%) e destino (77%) das 4,3 mil toneladas de goiaba recebidas anualmente pela CEAGESP (<http://www.irrigar.org.br/pademb/?fr=goi&tipo=fr&new=2>).

No Paraná, as principais regiões produtoras de goiaba são Santo Antonio da Platina (53,7%), Umuarama (30,4%) e Cornélio Procopio (12,9%), e os principais municípios produtores Carlópolis (51,5%), São Tomé (17,7%) e Cianorte (12,7%). No total são 126 produtores, com 197 pomares em produção e 86 que ainda não entraram em produção. A produção em 2001 totalizou 4989 toneladas numa média de 25,389 kg por hectare (Emater-PR).

2.2 A GOIABEIRA (*Psidium guajava* L.)

A origem asiática ou americana da goiabeira é um assunto muito discutido. Durante o período compreendido entre 1514-1557, o cronista espanhol Oviedo escreveu as primeiras referências sobre a goiabeira, utilizando o nome de guayabo e fazendo considerações sobre o seu comportamento vegetativo em algumas regiões das Índias (Ruehle, 1964). Acredita-se

que foram os espanhóis que transportaram a goiabeira do Pacífico para as ilhas Filipinas e Índias, espalhando-se então para a Maláia, Hawaí e África do Sul (Soubihe Sobrinho, 1951). Sem precisar qual a região, Koller (1979) refere-se à goiabeira como sendo originária de regiões de clima tropical. Ochse (1966) cita que a goiabeira é nativa do Brasil, de onde se difundiu para todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo.

Encontra-se dispersa em todas as regiões tropicais e subtropicais, devido à adaptação a diferentes condições edafoclimáticas e propagação por meio de sementes (Gonzaga Neto, 1990).

A goiabeira (*Psidium guajava* L.) é a espécie mais importante do gênero *Psidium*, onde estão agrupadas mais de 150 espécies, sendo todas consideradas plantas nativas da América, com espécies produtoras de frutos com grande número de sementes. A classificação botânica da goiabeira é a seguinte (Manica, 2000):

Reino: Vegetal

Divisão: *Spermatophyta*

Subdivisão: *Angiospermae*

Classe: *Dicotyledoneae*

Ordem: *Myrtiflorae*

Subordem: *Myrtineae*

Família: *Myrtaceae*

Gênero: *Psidium*

Espécie: *Psidium guajava* L.

Os frutos da goiabeira são bagas de tamanho, forma e coloração da polpa variável, em função da variedade (Koller, 1979).

Em um fruto de goiabeira, aproximadamente 20% correspondem a casca, 50% a polpa e 30% a sementes (Adsule & Kadam, 1995).

Encontram-se no centro da polpa pequenas sementes duras (153 a 664/fruto). Inúmeros esclerídeos conferem a polpa textura granulada. O fruto maduro emite doce aroma, com sabor ácido e doce agradável (Wilson, 1980).

2.3 IMPORTÂNCIA ALIMENTAR, ECONÔMICA E SOCIAL

A cultura da goiabeira apresenta importância econômica real e potencial no Brasil, em virtude das múltiplas formas de aproveitamento de seus frutos (Maia *et alii.*, 1988). O consumo da fruta in natura é pequeno, sendo estimado em 300 g/per capita/ano, embora a

goiabada seja um dos doces mais apreciados pelos brasileiros. Na medicina popular é recomendada no combate ao escorbuto e diarreia (<http://www.irrigar.org.br/pademb/?fr=goi&tipo=fr&new=2>).

O comércio mundial da goiaba e de seus derivados tem pouca expressão, quando comparado ao e outras frutas tropicais, como a banana, a manga e o melão. A preferência do mercado externo está sintonizada para a fruta de polpa branca, em contraposição ao mercado interno onde a opção é pela de polpa vermelha.

A “maçã dos trópicos” tem a maior parte da produção consumida como fruta fresca, e o restante processado sob as formas de goiabada, geléia, bala, suco, polpa, vinho, fruta seca e conservas (Salunkhe *et alii*, 1995).

A excelente qualidade da goiaba é atribuída ao elevado teor nutritivo, excelente propriedades organolépticas, alto rendimento por hectare e polpa de elevada qualidade industrial. Rica em vitamina C, com valores seis a sete vezes superiores ao dos frutos cítricos (fonte tradicional desta vitamina), não supera apenas as quantidades presentes na acerola, camu-camu e caju. Em variedades silvestres, pode-se encontrar 600 a 700 mg e nas melhores cultivares de 240 a 300 mg de ácido ascórbico/100 g de fruta. Destaca-se ainda pelo elevado conteúdo de açúcares, vitamina A e vitaminas do grupo B (tiamina e niacina) e teores significativos de fósforo, ferro e cálcio. Com aroma e sabor característicos, possui alto teor de fibras que confere a capacidade de alta digestibilidade. O aproveitamento da polpa apresenta-se sob a forma de goiaba em caldas ou fatias, doces em massas (goiabadas), geléias, geleizados, sucos, néctar, sorvete e base para xaropes e bebidas (Carvalho, 1994).

Em razão do prolongamento do período de safra, e conseqüentemente um número maior de colheitas, há necessidade de mão-de-obra, praticamente durante o ano todo. Destaca-se, ainda, a oferta de matéria-prima (goiabas) durante 8 ou 9 meses, que propicia maiores oportunidades de emprego na indústria (Gonzaga Neto *et alii*, 1982).

2.4 PRODUÇÃO INTEGRADA DE FRUTAS – PIF

A Produção Integrada de Frutas é uma exigência dos mercados importadores, principalmente da Comunidade Européia, rigorosa em requisitos de qualidade e sustentabilidade, enfatizando a proteção do meio ambiente, segurança alimentar, condições de trabalho, saúde humana e viabilidade econômica. O sistema é parte do conteúdo do PROGRAMA DE DESENVOLVIMENTO DA FRUTICULTURA (PROFRUTA), integrante do

Plano Plurianual 2000/2003 como uma das prioridades estratégicas do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (Pratini de Moraes, 2002).

A Produção Integrada de Frutas (PIF) caracteriza-se como um sistema de produção que gera alimentos e demais produtos de alta qualidade, mediante o uso de recursos naturais e regulação de mecanismos para a substituição de insumos poluentes (Boletim IOBC/WPRS, 1999).

As vantagens da Produção Integrada de Frutas (PIF) e sua viabilidade para adoção no Brasil, demonstrada pelo trabalho com a maçã, fizeram que Instituições de Pesquisa e de Ensino do país aceitassem e adotassem este sistema de produção como uma alternativa para outras culturas. Assim, estão sendo estudadas as Normas para Produção Integrada de uva e manga no Vale do São Francisco, de citros, mamão papaia, coco e uva vinífera e, encontra-se em andamento o programa de Produção Integrada de pêssego no Rio Grande do Sul (Sanhueza, 2001) e no Paraná (May de Mio, 2002).

A partir de 2003, a União Européia começará a exigir certificação de qualidade das frutas que importa, certificação de produção integrada para frutas de clima temperado e em 2.005 a exigência valerá para todas as frutas. Produtores do Paraná devem ficar de fora do mercado por que o Estado não atualizou a legislação que regulamenta a fruticultura. No Paraná, a lei estadual não permite o uso de agroquímicos recomendados pelo sistema de produção integrada de frutas, impasse a ser resolvido à curto prazo. O programa de certificação da produção integrada exige um ano de carência e treinamento, e depois mais um ano de produção, antes que seja concedido o selo de qualidade (Boletim Informativo – FAEP).

2.5 PROGRAMA BRASILEIRO PARA MELHORIA DOS PADRÕES COMERCIAIS E EMBALAGENS DE HORTIGRANJEIROS

Este programa teve origem em 1997, com o Programa Paulista para a Melhoria dos Padrões Comerciais e Embalagens de Hortigranjeiros, criado pelas Câmaras Setoriais de Frutas e de Hortaliças, no âmbito da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo. Denotado o interesse nacional no mesmo, este passou a ter caráter nacional a partir de janeiro de 2000.

Atualmente, este programa é preconizado e articulado pelo Centro de Qualidade em Horticultura da CEAGESP. Suas metas estão em sanar dois dos principais gargalos do setor que são a falta de classificação e padronização dos produtos, uma barreira à modernização

da comercialização e o uso de embalagens inadequadas.

Para a efetiva implantação deste programa em São Paulo, foram criados dois órgãos: a Câmara Setorial que incorporou o conceito de Cadeia Produtiva, do fornecedor de insumos ao consumidor final, e os Conselhos Regionais de Desenvolvimento Rural. Para a coordenação destes foi criada, dentro da Secretaria da Agricultura e Abastecimento, a Coordenadoria para o Desenvolvimento dos Agronegócios (CODEAGRO).

Uma característica peculiar deste programa está na adesão voluntária. Esta ocorre pela percepção dos diversos agentes que compõem a Cadeia Produtiva de Frutas (CPF) da necessidade da melhor organização e coordenação deste setor. O Programa Brasileiro para a Melhoria dos Padrões Comerciais e de Embalagens de Hortigranjeiros mudou de nome, em janeiro de 2002, para Programa Brasileiro para a Modernização da Horticultura, por decisão das Câmaras Setoriais de Frutas e de Hortaliças, Cebola e Alho (CEAGESP).

2.5.1 Programa Paranaense Para Melhoria Dos Padrões Comerciais E Embalagens De Frutas - Hortiqualidade - Pr

O potencial de produção no Estado é muito grande pelas condições privilegiadas de solo e clima, mas a produtividade média ainda está aquém daquela possível de ser obtida, com a utilização da tecnologia disponível. O crescimento da produção estadual de frutas tem sido significativo, passando de 377 mil toneladas em 1992 para 703 mil em 1997.

Em busca da profissionalização e organização do setor, por meio da racionalização da comercialização de frutas para garantir melhores condições de atendimento ao consumo e renda à produção, foi elaborado o PROGRAMA PARANAENSE PARA MELHORIA DOS PADRÕES COMERCIAIS E EMBALAGENS DE FRUTAS - HORTIQUALIDADE - PR, um acordo de cooperação técnica entre Secretaria da Agricultura e seus órgãos vinculados a Federação da Agricultura do Estado do Paraná (FAEP) e seus órgãos vinculados - SENAR-PR, o SEBRAE-PR e Sindicato e Organização das Cooperativas do Estado do Paraná (OCEPAR).

O Programa começou a ser implantado em dezembro de 1999 e baseia-se na experiência do Programa Brasileiro, destacando a importância da CEAGESP para o contexto nacional, considerando a compatibilidade do trabalho com as normas de classificação da União Européia e Mercosul.

O kiwi será o primeiro produto a ser classificado pelo Programa Paranaense, com o apoio e consonância da CEAGESP. E o caqui, foi o primeiro trabalhado em função dos

resultados já obtidos na CEAGESP (Hortiqualidade-PR).

2.5.2 Proposta Referente À Classificação Da Goiaba Para O Programa Brasileiro Para A Melhoria Dos Padrões Comerciais E Embalagens De Hortigranjeiros

O objetivo desta norma consiste em definir as características de identidade, qualidade, acondicionamento, embalagem e apresentação da goiaba destinada ao consumo *in natura*.

A classificação é feita com base na coloração da polpa e da casca, ao calibre e incidência de defeitos.

As características varietais de coloração da polpa determinam o Grupo, sendo classificadas em vermelhas (polpa vermelha) e brancas (polpa branca).

O Subgrupo está relacionado à coloração de casca da goiaba com a faixa de pressão (g/cm^2) em que o fruto pode ser comercializado, dividindo-se em verde claro ($4-7 \text{ g/cm}^2$), verde amarelado ($3-4 \text{ g/cm}^2$) e amarelo ($2-3 \text{ g/cm}^2$). Admite-se até 20% de mistura de cores consecutivas numa mesma embalagem.

As Classes estão relacionadas ao calibre que corresponde ao diâmetro equatorial do fruto em mm, desta forma, a Classe 5 apresenta frutos com diâmetro igual ou maior que 50 a menor que 60, a 6 (igual ou maior que 60 a menor que 70), 7 (igual ou maior que 70 a menor que 80), 8 (igual ou maior que 80 a menor que 90), 9 (igual ou maior que 90 a menor que 100), 10 (igual ou maior que 100). É tolerada uma mistura de 10% de calibre diferente do especificada no rótulo, desde que pertencentes às classes imediatamente superiores e/ou inferiores. São toleradas 20% das embalagens do lote que estejam fora das especificações acima.

As Categorias são definidas como Extra e Categoria I, II e III, pela incidência de defeitos (graves e leves). Os defeitos graves são dano profundo (lesão não cicatrizada de origem diversa (pragas, ação mecânica, granizo, pedrisco, roedores, etc) que rompa a epiderme em qualquer profundidade), podridão (dano patológico que implique em qualquer grau de decomposição, desintegração ou fermentação dos tecidos, incluindo manchas de antracnose em qualquer número ou intensidade, que acima de 10% de qualquer podridão ocasiona a desclassificação do lote para comercialização não sendo permitida a reclassificação), alterações fisiológicas (originada por deficiência hídrica ou nutricional provocando anelamento necrótico no fruto) e imaturo (fruto que não alcançou o estágio de maturação ideal ou comercial). Os defeitos leves são lesão cicatrizada (lesão de origem

indeterminada cuja área individual ou em conjunto supere 1cm² sem afetar a polpa com a presença de tecido suberizado), dano superficial: (lesão que não rompe a epiderme, de origem diversa (mecânica, pragas, etc), cuja área individual ou em conjunto supere 1cm², com coloração verde escura característica), manchas (alteração da coloração normal da casca cuja área individual ou em conjunto supere 1cm²), deformação (desvio da forma característica da cultivar, provocado por alterações fisiológicas ou genéticas), amassado (desvio da forma característica da cultivar, provocado por dano físico) e umbigo mal formado (mal formação causada pela retirada do botão floral tardiamente ou precocemente). O lote mínimo para amostra é de 100 frutos.

Frutos rígidos constituem-se numa das exigências dos importadores em relação à goiaba, que apresenta como principais problemas o amolecimento rápido e a vida útil curta, existindo a proibição de entrada de goiabas nos EUA e Japão (Embrapa Fruticultura e Mandioca).

2.6 ANTRACNOSE EM FRUTOS DE GOIABEIRA (*Psidium guajava* L.)

A antracnose é considerada uma das mais graves doenças em frutos de goiabeiras, causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Arx (=Gloeosporium psidii Delacr.) cuja forma sexuada corresponde a *Glomerella cingulata* (Ston.) Spauld & Schrenk (FRUPEX, 1996).

O patógeno pode afetar folhas em qualquer fase de desenvolvimento, ramos novos, flores e frutos. Durante estações chuvosas, ocorre o crestamento dos ramos novos, que ficam de coloração púrpura, tornando-se pardo-escuros, secos e quebradiços. Os sintomas nas folhas e frutos são geralmente áreas mais ou menos circulares e de coloração escura. Quando a infecção se dá pelo botão floral, o fruto apresenta podridão, ocorrendo escurecimento a partir do pedúnculo em parte ou em toda a fruta. Nos frutos com ataque precoce, na sua fase inicial, aparecem manchas circulares, secas, elevadas e de pústulas em forma de cancos. Em ataques mais severos, as lesões são deprimidas, encharcadas, de coloração marrom, principalmente em locais danificados por insetos, podem coalescer resultando em uma grande mancha de formato irregular. A alta umidade favorece o desenvolvimento de uma massa de esporos de cor alaranjada sobre o centro da lesão. A área atacada não acompanha o crescimento do fruto e se rompe. A infecção não penetra na polpa, mas inutiliza os frutos para o mercado de consumo ao natural. No caso de infecção severa, os frutos tornam-se mumificados e pretos. A penetração do fungo se dá por meio de

ferimentos causados por insetos, lesões durante o manuseio e pela cavidade floral. Pela superfície intacta do fruto, ocorre a penetração direta pela prévia formação de apressórios (Junqueira, 2000).

Fungos do gênero *Colletotrichum*, causadores das antracnoses, costumam provocar infecções latentes em frutos de várias espécies vegetais. Penetram nos frutos ainda verdes que aparentam completa sanidade, permanecendo inativos até o amadurecimento podendo então, apresentar devido à colonização grande quantidade de lesões (Amorim, 1995).

A temperatura ideal para que ocorra a infecção é de 22 °C a 25 °C (Junqueira, 2000). Na temperatura de 30 °C, ocorre o melhor crescimento, esporulação e germinação. À medida que a temperatura diminui, o crescimento é reduzido proporcionalmente, atingindo o mínimo a 4,5 °C. Em locais, com umidade relativa do ar inferior a 50%, o crescimento do fungo é retardado ou paralisado (FRUPEX, 1996).

2.7 O PATÓGENO *Glomerella cingulata* (*Colletotrichum gloeosporioides* Penzig)

O gênero *Glomerella* é normalmente representado por suas formas imperfeitas ou conidiais, os gêneros *Colletotrichum* e *Gloeosporium* citados como os principais agentes causais da antracnose e classificados como parasitas de plantas ou saprófitas de matéria orgânica. *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides* pertencem ao Reino Fungi e a Divisão *Eumycota*, apresentando a seguinte classificação:

Espécie: *Glomerella cingulata*

Gênero: *Glomerella*

Família: *Gnomoniaceae*

Ordem: *Sphaeriales*

Classe: *Pyrenomycetes*

Subdivisão: *Ascomycotina*

Espécie: *Colletotrichum gloeosporioides*

Gênero: *Colletotrichum*

Família: *Melanconiaceae*

Ordem: *Melanconiales*

Classe: *Coleomycetes*

Subdivisão: *Deuteromycotina*

Os fungos da subdivisão *Ascomycotina* se reproduzem sexualmente por esporos endógenos (ascósporos), originados no interior de ascas e agamicamente por esporos

formados sobre ramificações do micélio (conidióforos) ou no interior de corpos frutíferos denominados acérvulos (Silveira, 1995). Os conídios nos acérvulos estão envolvidos por uma matriz mucilaginosa constituída de polissacarídeos e proteínas solúveis em água, que provavelmente os protegem da dissecação e aumenta a eficiência de germinação e penetração no tecido hospedeiro (Perfect *et alii*, 1990).

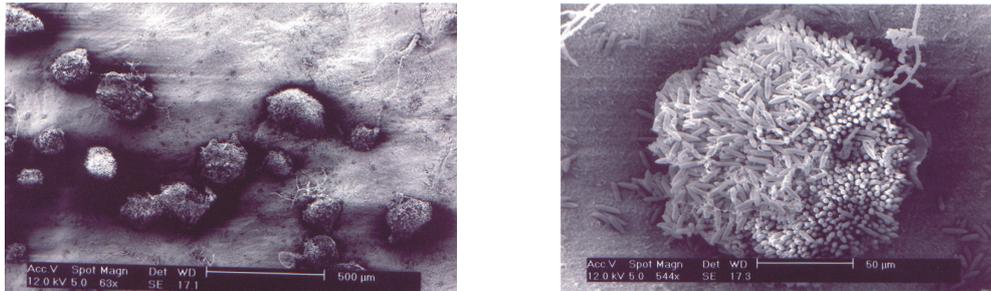


FIGURA 1 - Acérvulos do patógeno *Colletotrichum gloeosporioides* na epiderme do fruto da goiabeira por microscopia eletrônica de varredura.

O gênero *Colletotrichum* pertence ao grupo de doenças que causam a destruição de órgãos de reserva apresentando-se como uma podridão mole de origem fúngica. A sintomatologia típica das podridões moles, efetiva-se devido à produção de enzimas pectolíticas e toxinas pelo patógeno, as quais promovem desorganização a nível celular correspondente às lesões de aspecto encharcado que se desenvolvem com rapidez e, além de deprimidas apresentam massa cotonosa constituída de hifas e estruturas de frutificação (Bedendo, 1995).

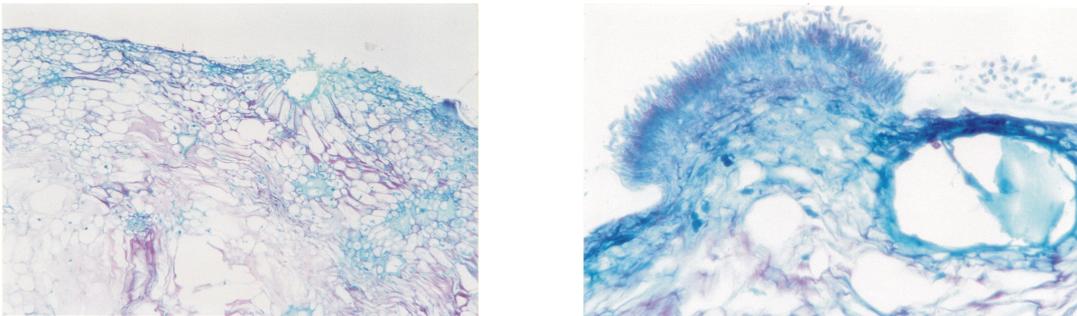


FIGURA 2 - Desorganização a nível celular promovida pelo patógeno *Colletotrichum gloeosporioides*.

Espécies do gênero *Colletotrichum*, durante a colonização do hospedeiro, exibem como estratégias de nutrição, os modos biotrófico (nutrientes obtidos de células vivas do hospedeiro) e necrotrófico (nutrientes obtidos de células mortas pelo fungo no hospedeiro). As estratégias de infecção caracterizam-se pela colonização intracelular ou colonização

subcuticular intramural/intraparede. Em ambos os casos, inicialmente, os conídios aderem e germinam na superfície da planta, produzindo tubos germinativos e então apressórios para a penetração da cutícula. Após a penetração subcuticular intramural, ocorre a formação de cadeia de hifas (micélio) inter e intracelular que colonizam rapidamente o tecido e provocam a sua morte (Perfect *et alii*, 1990).

2.8 CONTROLE ALTERNATIVO

Ao lado da indução de resistência, a exploração da atividade biológica de compostos secundários presentes no extrato bruto ou óleo essencial em plantas medicinais pode constituir-se em mais uma forma potencial de controle alternativo de doenças de plantas cultivadas (Schwan-Estrada *et alii*, 2000).

A indução de resistência pode ser chamada de resistência sistêmica adquirida, ou de indução de proteção ou imunidade adquirida envolve a ativação de mecanismos de defesa latente, existentes nas plantas, em resposta ao tratamento com agentes bióticos ou abióticos (Hammerschmidt & Dann, 1997).

Os mecanismos de resistência induzidos classificam-se em estruturais (papila, lignificação, e tilose) e bioquímicos com o acúmulo de fitoalexinas e de proteínas relacionadas à patogênese (b-1,3 glucanase e quitinase degradadoras da parede celular de fungos) (Pascholati & Leite, 1995). As fitoalexinas são metabólitos secundários, antimicrobianos, de baixo peso molecular, produzidos pelas plantas em resposta à estresses físicos, químicos ou biológicos, sendo capazes de impedir ou reduzir a atividade de agentes patogênicos (Purkayastha, 1995). A ação das fitoalexinas sobre o fungo inclui a granulação citoplasmática, a desorganização dos conteúdos celulares e inibição de enzimas fúngicas, inibindo a germinação e alongação do tubo germinativo e reduzindo ou inibindo o crescimento micelial (Lo *et al.*, 1996).

No metabolismo vegetal são produzidos produtos químicos denominados metabólitos primários ou macromoléculas (lipídeos, os protídeos e glicídeos), essenciais a todos os seres vivos, com funções vitais bem definidas. e os metabólitos secundários ou micromoléculas. Os produtos do metabolismo primário, através de rotas biossintéticas elaboradas, diversas e freqüentemente desconhecidas, originam às custas de gastos elevados de energia os metabólitos secundários que geralmente apresentam estrutura complexa, baixo peso molecular, marcantes atividades biológicas e, diferentemente dos metabólitos primários, são encontrados em baixas concentrações e em determinados grupos de plantas. Os vegetais consomem essa energia para sintetizar compostos

necessários para a sua sobrevivência e preservação (defesa vegetal), que agem como dissuasórios alimentares e toxinas (von Poser e Mentz, 2000).

Uma vasta gama de compostos orgânicos naturais de origem vegetal, produtos do metabolismo primário e secundário, é biologicamente ativa, isto é, têm ação: tranqüilizante, analgésica, antiinflamatória, citotóxica, anticoncepcional, antimicrobiana, antiviral, fungicida, inseticida, dentre outros (Pletsch, 2002). De acordo com Teske & Trentini (1997), a concentração de princípios ativos, não se apresenta uniforme durante o ciclo de vida da planta, variando com o habitat, a colheita e a preparação. Citam como principais princípios ativos: os alcalóides, os princípios amargos, os óleos essenciais, os taninos, os heterosídeos, os flavonóides, as saponinas, as mucilagens e os ácidos orgânicos.

Os óleos voláteis são definidos pela International Standard Organization (ISO) como produtos obtidos de partes de plantas através de destilação por arraste de vapor d'água ou por expressão (prensagem) de pericarpos de frutos cítricos. De forma geral, são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas. As denominações óleos essenciais, óleos etéreos ou essências derivam das características físico-químicas. Assim, as designações, óleo são devidas à aparência oleosa em temperatura ambiente destas substâncias líquidas; essências pelo aroma agradável e intenso, outra característica importante; etéreos, ou em latim *aetheroleum* pois são solúveis em solventes orgânicos apolares como éter, porém em água apresentam solubilidade limitada. Entretanto, a principal característica é a volatilidade que os difere dos óleos fixos (mistura de substâncias lipídicas), obtidos geralmente de sementes. Outras características são o sabor, geralmente acre (ácido) e picante, são poucos os óleos que apresentam cor como o óleo volátil da camomila que é azulado devido ao alto teor de azulenos, geralmente são ligeiramente amarelados ou incolores quando recentemente extraídos; não são muito estáveis, na presença de ar, luz, calor, umidade e metais (Simões e Spitzer, 2000).

Trabalhos desenvolvidos com extrato bruto ou óleo essencial, obtidos a partir da flora nativa têm indicado o potencial de controle de fitopatógenos, tanto pela ação fungitóxica direta, inibindo o crescimento micelial e a germinação de esporos, quanto pela indução de fitoalexinas, indicando a presença de composto(s) com característica de elicitor(es). (Stangarlin *et alii*, 2000; Schwan-Estrada, 2000).

Extratos aquosos, obtidos a partir do tecido foliar de duas formas de *Lippia alba*, não apresentaram diferenças significativas sobre o crescimento vegetativo/micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*, quando comparados à testemunha (Santos, 1996).

No controle alternativo de fitopatógenos *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Alternaria alternata*, *Phytophthora* sp. e *Colletotrichum graminicola*, houve 100% de inibição

do crescimento micelial dos fungos testados em todas as alíquotas do óleo de manjerição (*Ocimum basilicum*). Em óleo de carqueja (*Baccharis trimera*), houve crescimento de todos os fungos até a alíquota de 100 mL e inibição de 100% para as demais alíquotas (500 e 1000 mL). Em óleo de arruda (*Ruta graveolens*), apenas *Alternaria alternata* apresentou crescimento micelial até a alíquota de 40 mL (inibição de 74%), havendo inibição de 100% no crescimento nas alíquotas de 100, 500 e 1000 mL. Em presença do extrato bruto, *Ruta graveolens* e *Ocimum basilicum* inibiram totalmente o crescimento micelial de *Sclerotium rolfsii*, em concentrações acima de 10%. O extrato bruto de *Baccharis trimera* apenas inibiu parcialmente o crescimento micelial dos fungos fitopatogênicos testados. No bioensaio para a detecção de compostos fungitóxicos presentes no extrato bruto das plantas medicinais, foi possível verificar a presença de frações nas quais houve inibição do desenvolvimento de fungos fitopatogênicos e na indução de alguns mecanismos de defesa das plantas (Stangarlin, 1999).

Propriedades fungitóxicas foram detectadas nos extratos aquosos obtidos a partir de bulbilhos de alho, folhas de hortelã e mamona e frutos de pimenta, evidenciando o uso potencial dos mesmos como alternativa aos métodos físicos e químicos, convencionalmente, usados para o controle de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente de podridão em frutos de mamoeiro. Estes extratos incorporados em BDA, nas concentrações de 100, 200, 500, 1000, 5000 e 10000 ppm, demonstraram efeito inibitório a partir da concentração de 200 ppm, no crescimento e produção de conídios de um isolado de *Colletotrichum gloeosporioides*. O extrato de alho inibiu o crescimento micelial, em porcentagens variáveis de 5,3 a 67,6%, porém não atuou de modo expressivo sobre a produção de conídios. Os extratos de hortelã, mamona e pimenta promoveram inibição menos acentuada do crescimento de micélio, porém reduziram drasticamente a produção de conídios em níveis variáveis de 41 a 84%, de acordo com as concentrações crescentes dos mesmos (Ribeiro, 1999).

Óleo essencial de eucalipto, das espécies *Eucalyptus urophylla*, *E.camaldulensis* e *E. citriodora* nas concentrações de 5, 50 e 500 mg/kg foi empregado sobre os fitopatógenos *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* e *Bipolaris sorokiniana* para avaliação de atividade fungitóxica. Nas concentrações de 500 mg/kg dos óleos, foram observadas inibições significativas no crescimento micelial das espécies fúngicas, após período de 7 dias. No entanto, o óleo essencial de *Eucalyptus urophylla* foi o que apresentou maior ação fungitóxica, que foi atribuída à presença do composto denominado globulol, ausente no *E.camaldulensis* e no *E. citriodora* (Salgado, 2003).

Extratos aquosos, metanólicos e etanólicos de albedo de laranja foram avaliados, *in*

vitro, sobre a germinação, formação de apressório e crescimento micelial de *Phyllosticta citricarpa*, agente da mancha preta dos citros (MPC), doença que limita a exportação de laranja brasileira para o Japão e países da Europa. Os resultados experimentais mostraram que os extratos de albedo, nas concentrações de 10 e 100 mg / mL de água, foram capazes de inibir em 100% a germinação, formação de apressório e o crescimento micelial de *Phyllosticta citricarpa*. Observou-se que os extratos, dependendo da concentração, podem ter ação fungicida ou fungistática (Cardoso Filho, 2003).

Avaliou-se o potencial fungitóxico de *Ottonia martiana* frente ao patógeno *Cylindrocladium spathulatum*, pelo teste de inibição do crescimento micelial. Resultados obtidos demonstraram que o extrato de *O. martiana* apresenta atividade antifúngica, pois inibiu em mais de 40% o crescimento micelial do *C. spathulatum* em folhas de *Ilex paraguariensis* (erva-mate) (Cunico, 2003).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Fitopatologia, do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, no Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná da UFPR, em Curitiba/PR.

3.1 OBTENÇÃO DE ISOLADOS DO PATÓGENO *Glomerella cingulata* (*Colletotrichum gloeosporioides*)

Frutos verdes de goiabeira (*Psidium guajava* L.), cultivares Iwao ou Carlópolis (polpa branca) e Paluma (polpa vermelha), foram adquiridos na Central de Abastecimento de Curitiba (CEASA - PR).

Para obtenção de isolados do patógeno, estes frutos foram acondicionados individualmente em câmaras úmidas (embalagens plásticas tampadas e com algodão umedecido), mantidas no ambiente a temperatura média de 22 °C.

Por meio de isolamento direto, estruturas fúngicas caracterizadas por uma massa de esporos de coloração alaranjada/salmão e micélio das lesões maiores, foram transferidas para placas de Petri contendo o meio de cultura ágar-água (AA) a 2% , com auxílio de estilete, em câmara de fluxo e condições assépticas, sendo as placas mantidas em estufa a 28 ± 2 °C no escuro.

3.2 DIFERENCIAÇÃO DOS ISOLADOS: CRESCIMENTO MICELIAL, PATOGENICIDADE E ESPECIFICIDADE

O crescimento micelial foi avaliado estatisticamente para a diferenciação dos 12 isolados, de acordo com as médias obtidas a partir de medidas diametralmente opostas das colônias aos 3, 5, 7 e 9 dias, num total de 3 médias ou 3 repetições por isolado. Neste experimento, discos de 5 mm de diâmetro, contendo micélio dos isolados do patógeno cultivados em meio ágar-água (AA), foram repicados em condições assépticas para placas de Petri (90mm) com o meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar) e, mantidos em estufa a 28 ± 2 °C, no escuro.

Para a avaliação de patogenicidade de *Glomerella cingulata* (*Colletotrichum gloeosporioides*), frutos verdes de goiaba de polpa vermelha e polpa branca foram inoculados com os respectivos isolados. Desta forma, frutos de polpa vermelha foram inoculados com isolados 1V₁ - 2V₁ - 3V₁ - 3V₂ - 3V₃ - 4V₁ obtidos de frutos de polpa vermelha e, frutos de polpa branca, inoculados com os isolados 1B₁ - 2B₁ - 2B₂ - 2B₃ - 3B₁ - 3B₂ obtidos de frutos de polpa branca.

Por meio de inoculação cruzada foi avaliada a especificidade, inoculando-se frutos de polpa vermelha da cultivar Paluma com os isolados de polpa branca da cultivar Iwao (1B₁ - 2B₁ - 2B₂ - 2B₃ - 3B₁ - 3B₂), e frutos de polpa branca com os isolados de polpa vermelha (1V₁ - 2V₁ - 3V₁ - 3V₂ - 3V₃ - 4V₁).

Foram inoculados 3 isolados por fruto com 3 repetições, sendo necessários 6 frutos de polpa vermelha e 6 frutos de polpa branca para avaliação de patogenicidade e mais 6 frutos de polpa vermelha e 6 frutos de polpa branca para avaliação de especificidade, totalizando 24 frutos, por meio de ferimentos feitos na cutícula com estilete contendo estruturas do patógeno, mantidos em câmaras úmidas a temperatura média de 22 °C.

A observação da presença ou ausência de lesões característica do patógeno nos ferimentos foi o parâmetro utilizado para as avaliações.

3.3 CONTROLE ALTERNATIVO DE *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides*, *in vitro*

3.3.1 Seleção de plantas medicinais

Para a avaliação do potencial de inibição e/ou ação fungicida sobre o crescimento micelial de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides* foram selecionadas algumas plantas medicinais e aromáticas citadas em uma relação de espécies indicadas para cultivo na Região Centro-Sul em função das condições edafoclimáticas (Corrêa Júnior, 1991).

Devido ao restrito o modo de ação fungicida, plantas com ação anti-séptica, antibacteriana ou bactericida e antiinflamatória foram utilizadas.

Na Tabela 1, estão relacionadas, as plantas medicinais selecionadas para a avaliação do potencial de inibição e/ou ação fungicida sobre o crescimento micelial de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides*.

O material botânico foi fornecido pela Empresa CHAMEL Indústria e Comércio de

Produtos Naturais Ltda, produtora e fornecedora de plantas medicinais, exceto a camomila, o cravo, a goiaba, a laranja e a marcela que foram doadas por produtores.

TABELA 1 - Plantas medicinais selecionadas para a avaliação do potencial de inibição e/ou ação fungicida sobre o crescimento micelial de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides*.

Nome comum	Nome científico	Partes utilizadas*
Alecrim	<i>Rosmarinus officinalis</i>	folhas e sumidades floridas
Alfavaca/Manjericão	<i>Ocimum basilicum</i>	planta inteira
Bardana	<i>Articum lappa, A. minus</i>	folhas
Calêndula	<i>Calendula officinalis</i>	folhas e flores
Camomila	<i>Chamomila recutita</i>	capítulos florais
Capim-limão	<i>Cymbopogon citratus</i>	folhas
Cavalinha	<i>Equisetum sp.</i>	parte aérea
Cravo-da-Índia**	<i>Syzygium aromaticum</i>	flor
Espinheira-santa	<i>Maytenus ilicifolia</i>	folhas
Funcho	<i>Foeniculum vulgare</i>	frutos
Gengibre	<i>Zingiber officinale</i>	rizomas
Goiabeira**	<i>Psidium guajava</i>	folhas
Hortelã	<i>Mentha piperita</i>	folhas
Laranja**	<i>Citrus sinensis</i>	casca
Lípia	<i>Lippia alba</i>	folha/flor/caule
Marcela	<i>Achrylocline Satureioides</i>	inflorescências
Quebra-pedra	<i>Phyllanthus sp.</i>	flor, raiz, semente
Sabugueiro	<i>Sambucus nigra</i>	semente
Tansagem	<i>Pantago australis, P. major</i>	parte aérea
Tagetes	<i>Tagetes minuta</i>	folha/flor/caule

*fonte: Herbarium Compêndio de Fitoterapia (1997).

**Não fazem parte da relação de espécies indicadas para cultivo na Região Centro-Sul em função das condições edafoclimáticas.

3.3.2 Potencial de inibição de extratos aquosos sobre o crescimento micelial de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides*, *in vitro*

3.3.2.1 Preparo do extrato aquoso

O extrato aquoso foi preparado pelo método de decocção, que consiste em manter o material vegetal em contato, durante certo tempo, com um solvente (normalmente água) em ebulição (FALKENBERG *et alii*, 2000).

Foram utilizados 100 g das partes recomendadas das plantas, para 1 L de meio BDA (250 g de batata, 20 g de dextrose e 20 g de ágar) em recipientes de vidro, nos quais pedaços de tecido de nylon fixados com elásticos foram colocados para posterior filtragem das plantas, e tampados com papel alumínio. E então, autoclavados durante 20 minutos a

120 °C e pressão de 1 atm, sendo em seguida vertidos em placas de Petri de 90mm de diâmetro.

Alecrim, alfavaca, bardana, calêndula, camomila, capim-limão, cavalinha, cravo-da Índia, espinheira-santa, funcho, gengibre, folhas de goiabeira, hortelã, lípia, quebra-pedra, sabugueiro, tansagem, tagetes e testemunha totalizaram 19 tratamentos com 3 repetições tanto para *Glomerella cingulata* quanto para *Colletotrichum gloeosporioides*.

Discos de 5 mm de colônias da forma sexuada *Glomerella cingulata* (2V₁) e assexuada *Colletotrichum gloeosporioides* (4V₁) cultivados em AA com 15 dias de idade, respectivamente, foram repicados separadamente para o centro de placas de Petri contendo os tratamentos acima citados (planta medicinal + BDA), e a testemunha repicada em meio BDA.

Avaliou-se o crescimento micelial de *Glomerella cingulata* aos 3, 5, 7 dias e de *Colletotrichum gloeosporioides* aos 3, 5, 7 e 9 dias por meio de duas medidas opostas do diâmetro da colônia. Para a avaliação de esporulação de *Colletotrichum gloeosporioides*, 5 discos de 5 mm foram retirados da região localizada próxima ao disco inicial, aproximadamente 1,5 cm e acondicionados em tubos de ensaio com 5 mL de água esterilizada e 2 gotas de Azul de Amann, com o propósito de paralisar o crescimento micelial e a esporulação.

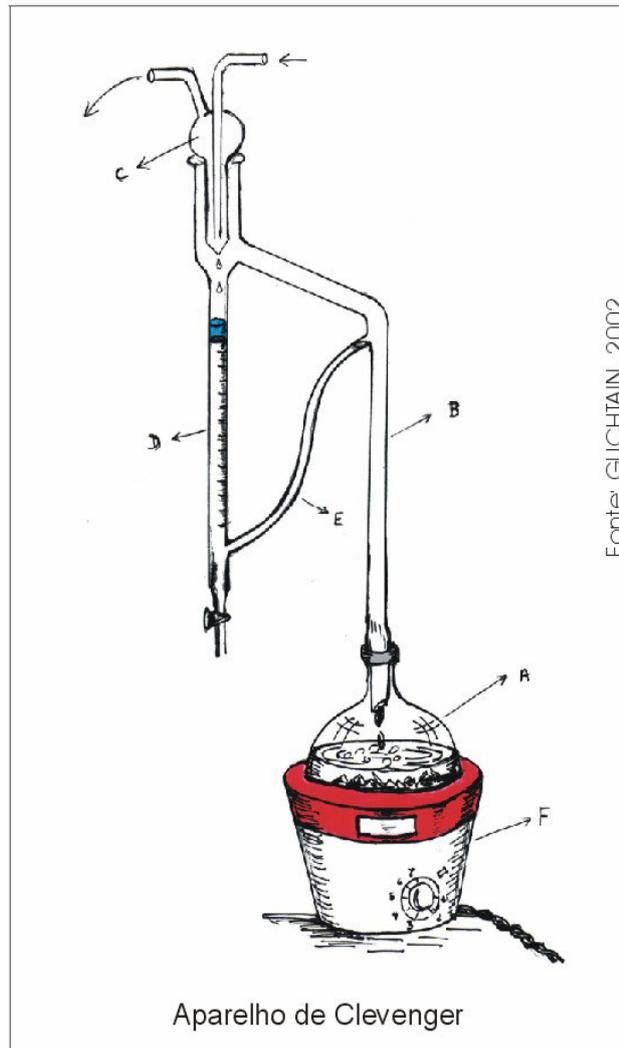
3.3.3 Potencial de inibição de óleos essenciais sobre o crescimento de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides*, *in vitro*

3.3.3.1 Extração de óleos essenciais

A extração de óleos essenciais foi realizada em equipamento do Laboratório de Fitoquímica, do Setor de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Paraná.

Os materiais botânicos foram reduzidos a fragmentos menores com auxílio de uma tesoura (material a fresco) ou de um moedor (material seco).

Para a extração e obtenção do óleo essencial foi empregado o aparelho de CLEVENGER (USP, XXII, 1990), utilizando o método de hidrodestilação, por arraste com vapor d'água. Tempo de extração foi de 5 horas ininterruptas. Decorrido este tempo, foram feitas as leituras do rendimento do óleo essencial (mL%, volume/massa), que foram armazenados em frasco âmbar em freezer. Na Figura 3, o aparelho de CLEVENGER está demonstrado.



APARELHO DE CLEVINGER: **A-** frasco de destilação, consistindo de um balão de fundo redondo com capacidade que vai de 100 a 3000 mililitros, com boca esmerilhada com afunilamento; **B-** coluna ascendente; **C-** condensador ou "dedo-frio"; **D-** tubo graduado o qual apresenta uma torneira na extremidade inferior; **E-** Tubo de retorno; a junta esmerilhada da coluna ascendente (B) se ajustará na boca esmerilhada do balão de destilação (A); **F-** o sistema de aquecimento se chama "manta de aquecimento" (marca Fisatom) que fica na parte inferior do aparelho de destilação, é elétrico e possui termostato para manter a temperatura constante, consiste numa peça com seu interior côncavo revestido de amianto onde se encaixa o frasco de destilação, até a parte mediana.

FIGURA 3 - Aparelho de CLEVINGER.

Na Tabela 2, estão relacionadas plantas medicinais e órgãos vegetais empregados para a extração de óleos essenciais, na forma seca, exceto capim-limão, gengibre, goiaba e laranja, na forma fresca.

TABELA 2 - Relação de plantas medicinais e os órgãos vegetais empregados para a extração de óleos essenciais.

Nome comum	Nome científico	Parte utilizada
Alecrim	<i>Rosmarinus officinalis</i>	folhas e sumidades floridas
Alfavaca/Manjeriçã	<i>Ocimum basilicum</i>	planta inteira
Calêndula	<i>Calendula officinalis</i>	folhas e flores
Camomila	<i>Chamomilla recutita</i>	capítulos florais
Capim-limão	<i>Cymbopogon citratus</i>	folhas
Cravo-da Índia	<i>Syzygium aromaticum</i>	flores
Funcho	<i>Foeniculum vulgare</i>	frutos
Gengibre	<i>Zingiber officinale</i>	rizomas
Goiabeira	<i>Psidium guajava</i>	folhas
Laranja	<i>Citrus sinensis</i>	casca
Lípia	<i>Lippia alba</i>	folha/flor/caule
Marcela	<i>Achrylocline satureioides</i>	inflorescências
Tagetes	<i>Tagetes minuta</i>	folha/flor/caule

Discos de 5 mm de *Glomerella cingulata* (forma sexuada) e *Colletotrichum gloeosporioides* (forma assexuada) cultivados em AA com 15 dias de cultivo foram repicados para placas de Petri contendo BDA, acrescentando-se 10 µl de cada óleo por placa, distribuído em três pontos eqüidistantes. A testemunha continha apenas o disco do patógeno repicado no centro da placa. O crescimento micelial foi avaliado pela medida do diâmetro da colônia, até a testemunha atingir a borda da placa. Para a avaliação de esporulação de *Colletotrichum gloeosporioides*, 5 discos de 5 mm foram retirados da região localizada entre disco inicial e os pontos contendo o óleo e acondicionados em tubos de ensaio com 5 mL de água esterilizada e 2 gotas de Azul de Amann, com o propósito de paralisar o crescimento micelial e a esporulação.

3.3.3.2 Potencial de inibição dos decoctos sobre o crescimento micelial de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides*, *in vitro*

A fase aquosa (decocto) resultante da hidrodestilação, na qual ocorreu o aquecimento constante durante 5 horas das plantas medicinais em água, foi separada do material botânico e utilizada na forma de subproduto da extração (decocto). Foram obtidos os decoctos de alecrim, alfavaca, camomila, capim-limão, cravo, funcho, gengibre, folhas de goiabeira vermelha, laranja baiana, lípia, marcela e tagetes.

Para a avaliação do potencial de inibição dos decoctos sobre o crescimento micelial de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides*, o meio de cultura para cada

tratamento foi preparado com 90 ml do decocto e 10 ml de caldo de batata, sendo 2 g de dextrose e 2 g de ágar adicionados individualmente.

O caldo de batata, normalmente preparado na proporção de 250 g de batata para 1 L de água destilada, neste experimento, para os 14 tratamentos foram utilizadas 350 g de batata para 140 ml d'água, sendo a quantidade de água reduzida no cozimento para posterior mistura com os decoctos. Na testemunha foi adicionada apenas água.

A avaliação foi feita com a medição do crescimento micelial por meio de duas medidas diametralmente opostas quando a testemunha atingiu 2/3 do diâmetro da placa de Petri.

3.4 CONTROLE DE *Colletotrichum gloeosporioides* EM FRUTOS DE GOIABEIRA

Na execução deste experimento foram utilizados frutos de goiabeira das variedades Iwao (polpa branca) e Paluma (polpa vermelha) cedidos por produtores da região de Carlópolis. Os frutos de polpa branca (tipos 12 e 15) ensacados estavam armazenados em caixas de papelão, e os de polpa vermelha a granel.

Nos tratamentos com ativadores de plantas, adubos foliares e extrato aquoso de cravo-da-Índia os frutos foram imersos durante 1 minuto em solução (produto + água) em temperatura ambiente.

Nos tratamentos com os óleos essenciais de cravo-da-Índia e capim-limão foram colocadas alíquotas de 10 µL em algodão e depositadas no centro da parte inferior das embalagens.

Os frutos foram acondicionados em embalagens plásticas transparentes vedadas com fita crepe e, 24 horas após os tratamentos inoculados.

Os ferimentos foram feitos com auxílio de estilete em 4 pontos equidistantes, marcados com caneta hidrográfica, para auxiliar em caso de deterioração severa. Uma testemunha não inoculada foi utilizada para observação de infecção latente.

A inoculação foi feita pela pulverização da suspensão de inóculo do patógeno na concentração de 1×10^5 conídios.mL⁻¹. Os esporos de *Colletotrichum gloeosporioides* foram obtidos a partir de cultura em meio BDA em placa de Petri, pela adição de água esterilizada, sendo removidos com auxílio de pincel e filtrados em tecido de nylon. A quantificação de esporos/mL de suspensão foi determinada em Câmara de Neubauer.

Os frutos foram mantidos a temperatura ambiente em torno de 25 °C, simulando condição de comercialização.

A avaliação foi feita pela presença de lesões nos ferimentos em 4, 6 e 8 dias após a inoculação.

Na Tabela 3, estão relacionados os tratamentos, classes e dosagens dos produtos utilizados na avaliação do potencial de inibição do patógeno *Colletotrichum gloeosporioides*, *in vivo*.

TABELA 3 - Produtos utilizados na avaliação do potencial de inibição do patógeno *Colletotrichum gloeosporioides*, *in vivo*.

Nome comercial	Classe	Dosagem
Fosfito K	Adubo foliar	1,50 ml.L ⁻¹ d'água
Fosfito CaB	Adubo foliar	1,50 ml.L ⁻¹ d'água
Ecolife	Ativador de planta	1,50 ml.L ⁻¹ d'água
Bion 500 WG	Ativador de planta	5 g.L ⁻¹ d'água
Cravo-da-Índia	Extrato aquoso	2,5 g.L ⁻¹ d'água
Capim-limão	Óleo essencial	10 µL
Cravo-da-Índia	Óleo essencial	10 µL

3.5 GERMINAÇÃO E FORMAÇÃO DE APRESSÓRIO DE *Colletotrichum gloeosporioides* EM MEMBRANA DE POLIESTIRENO

Para avaliação de germinação e formação de apressório de *Colletotrichum gloeosporioides*, lâminas de microscopia foram preparadas por imersão em solução composta por ½ placa de Petri de poliestireno dissolvida em 50 mL de acetato de amila, deixadas no ambiente para secar (LEITE & NICHOLSON, 1992).

Foram preparados extratos aquosos a 20% (1 g de planta medicinal para 5 mL de água destilada), autoclavados durante 20 minutos a 120 °C. A suspensão de conídios na concentração de 1×10^5 conídios/mL foi obtida a partir de colônia do patógeno cultivado em AA (ágar-água) com 25 dias de idade. Em alíquotas de 1 mL de cada extrato aquoso e na testemunha 1 mL de água destilada e esterilizada adicionou-se 1 mL de suspensão do patógeno, sendo 3 gotas de 100 µL desta solução, gotejada sobre as lâminas recobertas com poliestireno acondicionadas em placas de Petri (3 repetições) com algodão umedecido e mantidas em estufa a $28 \pm 2^\circ\text{C}$, no escuro. Após 24 horas, a germinação foi paralisada com Azul de Amann. Como parâmetro para avaliação, em microscópio ótico foram considerados 100 conídios de cada gota, sendo feita contagem do número de conídios com tubo germinativo e apressórios presentes, expressos em porcentagem de germinação e formação de apressórios.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 OBTENÇÃO DE ISOLADOS DO PATÓGENO *Glomerella cingulata* (*Colletotrichum gloeosporioides*)

Concomitantemente ao processo de maturação, observou-se o desenvolvimento de várias lesões características do patógeno *Glomerella cingulata* (*Colletotrichum gloeosporioides*) na casca dos frutos, correspondendo cada lesão a um isolado.

Na Tabela 4, estão descritos os isolados obtidos a partir de frutos de goiabeira, cultivares Iwao ou Carlópolis (polpa branca) e Paluma (polpa vermelha), cuja denominação refere-se ao número do fruto, cor da polpa vermelha (V) ou branca (B) e número da lesão subscrito.

TABELA 4 - Isolados do patógeno *Glomerella cingulata* (*Colletotrichum gloeosporioides*) obtidos a partir de frutos de goiabeira (*Psidium guajava* L.), cultivares Iwao ou Carlópolis (polpa branca) e Paluma (polpa vermelha).

Cor da Polpa	Frutos	Isolados
Vermelha	1	1V ₁
	2	2V ₁
	3	3V ₁ - 3V ₂ - 3V ₃
	4	4V ₁
Branca	1	1B ₁
	2	2B ₁ - 2B ₂ - 2B ₃
	3	3B ₁ - 3B ₂

A alta incidência de antracnose constitui-se num alerta em relação à utilização de fungicidas nos tratamentos fitossanitários de pré ou em pós-colheita no manejo da cultura da goiabeira, evidenciando a necessidade de serem desenvolvidos novos e efetivos métodos de controle e/ou reavaliados os métodos convencionais.

Manchas de antracnose em qualquer número ou intensidade de acordo com as normas referentes à classificação da goiaba do Programa Brasileiro Para A Melhoria Dos Padrões Comerciais E Embalagens De Hortigranjeiros inevitavelmente ocasionam a desclassificação do lote para comercialização, não sendo permitida a reclassificação.

4.2 DIFERENCIAÇÃO DOS ISOLADOS: CRESCIMENTO MICELIAL, PATOGENICIDADE E ESPECIFICIDADE

O crescimento micelial foi o parâmetro utilizado para a seleção dos isolados do patógeno, *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides*. Na Tabela 5, a análise estatística determinou os isolados 2V₁ e 4V₁ como os de crescimento mais rápido, sendo estes selecionados para a execução deste trabalho.

Nesta fase, observou-se que o crescimento micelial do isolado 2V₁, diferenciou-se dos demais não ocorrendo esporulação. A presença de ascósporos visualizados no microscópio ótico e a coloração acinzentada do micélio permitiram a conclusão de tratar-se de *Glomerella cingulata*, forma sexuada do patógeno.

TABELA 5 - Avaliação do crescimento micelial, em meio BDA, de *Glomerella cingulata* (*Colletotrichum gloeosporioides*), *in vitro*.

Isolados	Crescimento micelial de <i>Glomerella cingulata</i> (<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>) ¹ 7 dias
2V ₁	9.000 a
4V ₁	7.533 b
3V ₂	7.117 c
1B ₁	7.000 d
2B ₂	6.950 e
3V ₁	6.833 f
2B ₃	6.650 g
3B ₂	6.617 h
1V ₁	6.533 i
2B ₁	6.517 j
3V ₃	6.417 k
3B ₁	6.400 l
CV (%)	0.19

¹ Média de 3 repetições da medição do diâmetro da colônia. Dados originais.

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Devido à utilização do isolamento direto na obtenção dos isolados, surgiu a dúvida em relação a saprogênese ou patogênese dos mesmos.

A avaliação de patogenicidade de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides* veio a comprovar a capacidade dos mesmos em após inoculação causarem a infecção, que segundo Amorim (1995) é onde a doença como processo tem início, ocorrendo a colonização e desenvolvimento do patógeno no hospedeiro, provocando alterações em diversos processos fisiológicos, que se exteriorizam na forma de sintomas.

As lesões foram observadas tanto em frutos de polpa vermelha inoculados com isolados 1V₁ - 2V₁ - 3V₁ - 3V₂ - 3V₃ - 4V₁ obtidos de frutos de polpa vermelha, quanto os frutos de polpa branca, inoculados com os isolados 1B₁ - 2B₁ - 2B₂ - 2B₃ - 3B₁ - 3B₂ obtidos de frutos de polpa branca.

Sendo os frutos de cultivares diferentes Iwao ou Carlópolis (polpa branca) e Paluma (polpa vermelha), algumas variações na composição química como teor de açúcar, acidez e outras podem ocorrer, interferindo no desenvolvimento do patógeno e que podem gerar uma “preferência” ou especificidade. A inexistência de especificidade foi confirmada pela presença de lesões em todos os frutos de polpa vermelha inoculados com os isolados de polpa branca (1B₁ - 2B₁ - 2B₂ - 2B₃ - 3B₁ - 3B₂), e frutos de polpa branca inoculados com os isolados de polpa vermelha (1V₁ - 2V₁ - 3V₁ - 3V₂ - 3V₃ - 4V₁).

Frutos de macieira foram inoculados com o isolado 2V₁ a forma sexuada do patógeno, ocorrendo nos mesmos, deterioração da polpa em forma de V em direção as sementes, sintoma típico da podridão amarga da macieira causada por *Glomerella cingulata* ou *Colletotrichum gloeosporioides* (Jones & Aldwinckle, 1990) evidenciando-se a ausência de especificidade. No entanto, estudos mais detalhados devem ser realizados envolvendo maçã e goiaba e os isolados de ambas em testes de inoculação cruzada.

4.3 CONTROLE ALTERNATIVO DE *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides*, *in vitro*

4.3.1 Potencial de inibição de extratos aquosos sobre o crescimento micelial de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides*, *in vitro*

Os resultados da avaliação do potencial de extratos aquosos na inibição do crescimento micelial dos patógenos *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides*, *in vitro*, estão representados na Tabela 6 e nas Figuras 4 e 5, respectivamente.

O extrato aquoso de cravo apresentou-se como o melhor tratamento inibindo em 100% o crescimento micelial de *Glomerella cingulata*, O extrato aquoso de bardana favoreceu o crescimento do patógeno, embora apresente a propriedade fungicida como um de seus modos de ação (Teske & Trentini, 1997).

Os demais extratos inibiram parcialmente o crescimento micelial de *Glomerella cingulata*. O extrato aquoso de alecrim inibiu em 61,95%, em porcentagens inferiores, gengibre (47,21%), camomila (32,47%), alfavaca (32,07%), hortelã (29,28%), quebra-pedra

(27,69%), goiaba (25,10%), tagetes (23,71%), funcho (18,33%), cavalinha (16,14%), calêndula (15,94%), capim-limão (12,39%), espinheira-santa (9,76%), tansagem (7,77%), lípia (7,57%) e sabugueiro (3,59%).

TABELA 6 - Crescimento micelial de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides*, *in vitro*, em meio BDA, contendo extratos aquosos a 10%.

Extrato aquoso	Crescimento micelial ¹	
	<i>Glomerella cingulata</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
	7 dias	9 dias
Testemunha (BDA)	8.450 ab	8.725 abc
Alecrim	2.987 i	4.400 h
Alfavaca/Manjeriçã	6.250 efgh	8.375 abcde
Bardana	9.000 a	8.925 ab
Calêndula	7.163 bcdefg	7.563 e
Camomila	5.612 h	6.412 fg
Capim-limão	7.530 bcdefg	6.613 f
Cavalinha	6.925 cdefgh	8.575 abcd
Cravo-da-Índia	0.000 j	0.000 i
Espinheira-santa	7.450 bcdef	8.038 bcde
Funcho	6.450 efgh	7.825 cde
Gengibre	4.200 i	5.620 g
Goiaba	6.675 defgh	8.150 abcde
Hortelã	6.075 gh	8.750 abc
Lípia	7.587 bcde	7.787 de
Quebra-pedra	6.175 fgh	8.075 abcde
Sabugueiro	7.862 abcd	8.812 ab
Tagetes	6.587 defgh	7.825 cde
Tansagem	8.038 abc	8.995 a
CV (%)	15.04	8.90

¹ Média da medição do diâmetro da colônia de 3 repetições, sendo cada bloco composto por 1 placa. Dados originais. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste DMS a 5% de significância.

Na avaliação do potencial de inibição do crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*, *in vitro*, o extrato de cravo apresentou-se como um produto potencial, inibindo o desenvolvimento deste patógeno em 100%, em meio BDA na concentração de 10%, seguido do extrato de alecrim que inibiu o crescimento em 47,49%. Em porcentagens inferiores a 33%, foi observada a inibição na presença dos extratos de gengibre (32,53%), camomila (25,68%), capim-limão (21,62%), calêndula (11,78%), tagetes (10,23%), espinheira-santa (9,07%), quebra-pedra (6,37%), goiaba (5,79%), funcho (5,79%), lípia (4,83%), alfavaca (3,09%), cavalinha (2,32%). Os extratos aquosos de hortelã (-1,54%), sabugueiro (-1,74%), tansagem (-4,25%) e bardana (-4,25%) estimularam o crescimento micelial do patógeno, diferindo estatisticamente da testemunha.

Em experimento prévio, na concentração a 1%, também ocorreu 100% de inibição do crescimento micelial de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides*.



FIGURA 4 - Porcentagem de inibição do crescimento micelial de *Glomerella cingulata*, *in vitro*, em meio BDA contendo extratos aquosos de plantas medicinais a 10%.

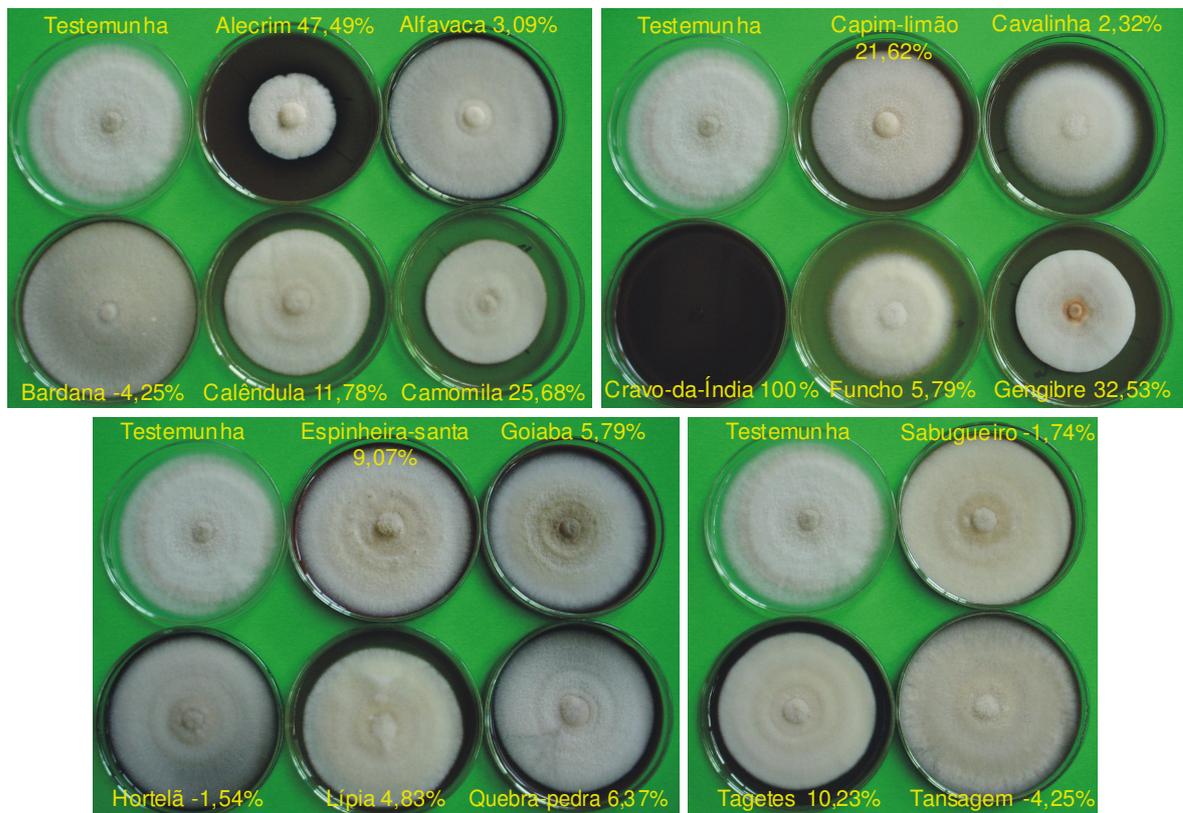


FIGURA 5 - Porcentagem de inibição do crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*, *in vitro*, em meio BDA contendo extratos aquosos a 10%.

A decoção é considerada uma técnica de emprego restrito, devido à alteração de muitas substâncias ativas pelo aquecimento prolongado, e sendo mais empregada em materiais vegetais duros e de natureza lenhosa (Falkenberg *et alii*, 2000).

Embora, no preparo dos extratos aquosos tenha sido utilizada a técnica de decoção de plantas secas, os resultados indicaram a existência de compostos secundários biologicamente ativos capazes de exercer atividade antifúngica sobre o patógeno *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides*, na maioria das plantas medicinais utilizadas.

Outros métodos de preparo de extratos aquosos poderão ser testados, utilizando-se plantas medicinais na forma seca ou *in natura* na tentativa de manter-se inalterada a atividade biológica dos metabólitos secundários ou obtê-los em maiores concentrações.

Entretanto, nesta primeira fase buscou-se uma forma mais prática ou caseira que permita ao próprio produtor preparar o extrato para utilização como método alternativo no controle da antracnose de frutos de goiabeira. Ainda, o cultivo de plantas medicinais pode vir a ser uma fonte de renda alternativa para o produtor.

Importante salientar que a utilização de uma planta medicinal é tão complexa quanto a sua composição, sendo a observação de alguns fatores, fundamental para a credibilidade e eficiência dos resultados, como procedência, identificação botânica, colheita (estágio de desenvolvimento da planta, época e horário de coleta), e tratamentos fitossanitários e qualidade. A qualidade das plantas constitui-se em outro fator de fundamental importância, pois do cultivo à comercialização alterações consideráveis podem ocorrer comprometendo a qualidade e a quantidade dos princípios ativos.

Segundo Ming (1994), devido ao grande número de plantas e da diversidade ambiental brasileira, pesquisas devem ser realizadas e o caráter interprofissional deve ser incentivado. Destaca, ainda, que uma vez feito o estudo farmacológico para testar a atividade dos diversos componentes das plantas medicinais, isoladamente ou não, quando da posse dos resultados sejam estes positivos, inócuos ou tóxicos, deve-se realizar a divulgação dos mesmos à população, fechando um ciclo e fazendo a integração de duas formas de conhecimento, a popular e a científica. Sendo o grande desafio da pesquisa agrônômica, o domínio dos fatores intrínsecos, ambientais e técnicos para que seja garantida a qualidade do material vegetal até a produção de medicamentos.

4.3.2 Potencial de inibição de óleos essenciais sobre o crescimento de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides*, *in vitro*

O óleo essencial de cravo-da-Índia inibiu totalmente o crescimento micelial de

Glomerella cingulata. O óleo essencial de capim-limão que inibiu em 100% até o quinto dia, apresentou redução no potencial de inibição para 62,77% no oitavo dia. O mesmo fato ocorreu com os óleos essenciais de alfavaca com redução de 52,02% aos 3 dias para 24,7% aos 8 dias, funcho de 84,8% para 20,88% e lípia de 69,3% para 25,9% (Anexo 2). A explicação deste fato pode ser atribuída à decomposição ou volatilização dos constituintes dos óleos que, então inibiam o crescimento micelial do patógeno.

No contato entre os óleos essenciais de camomila, gengibre e goiaba, formaram-se halos de inibição, provavelmente, devido à presença de compostos fixos com ação fungitóxica (Figura 6a). Nos tratamentos com os óleos essenciais de alfavaca, camomila, capim-limão, funcho, gengibre, goiaba, laranja e lípia, observaram-se alterações na coloração do micélio (Figura 6a). Atentando-se para o fato de que *Glomerella cingulata* representa a forma de reprodução sexuada do patógeno, com o desenvolvimento dos órgãos masculinos e femininos no micélio, onde após a união dos gametas, o zigoto pode desenvolver-se diretamente em uma asca ou indiretamente numa série delas (Silveira, 1995), formula-se a hipótese se tal modificação morfológica não representa a inibição do processo de reprodução pela interferência do óleo, voltando o micélio a função vegetativa de absorção de nutrientes e água. Os óleos essenciais de cravo e capim-limão inibiram em 100% o crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*.

Os óleos essenciais de alfavaca, funcho e gengibre, aos 3 dias inibiam o crescimento micelial em 88,89%, 93,33% e 92,78%, respectivamente, apresentando redução dos percentuais de inibição quando avaliados no décimo dia, porém superiores a 50% (Anexo 3).

Nos tratamentos com os óleos essenciais de camomila e goiaba foram observados halos de inibição, que podem ser associados à presença de compostos fixos com ação antifúngica.

Assim, tanto o aumento quanto à redução do potencial de inibição de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides*, podem estar associados à volatilização dos compostos destes óleos modificando a atmosfera no interior das placas de Petri. Na natureza, a difusão de traços (signals) de compostos voláteis pode induzir ou inibir a germinação ou o crescimento, ou desencadear alterações no desenvolvimento em plantas e fungos (French, 1992). Além de que, quando as hifas dos patógenos em questão, estruturas responsáveis pela absorção de água e nutrientes (Krugner & Bacchi, 1995) e, que formam o micélio, entram contato com o óleo, também os compostos secundários fixos como, por exemplo, saponinas, flavonóides presentes nos extratos aquosos ou nos óleos essenciais podem interferir inibindo ou estimulando o crescimento e a esporulação.

Nas Tabelas 7 e 8 e nas Figuras 6 e 7, estão representados os resultados obtidos na avaliação do potencial de inibição do patógeno *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides*, *in vitro*, em presença de óleos essenciais.

TABELA 7 - Crescimento micelial de *Glomerella cingulata* em presença de óleos essenciais, *in vitro*

Óleos essenciais	Crescimento micelial de <i>Glomerella cingulata</i> ¹		
	3 dias	5 dias	8 dias
Testemunha (BDA)	4.067 a	6.300 a	8.683 a
Alecrim	2.467 de	4.550 cd	8.067 a
Alfavaca	1.950 ef	3.587 ef	6.550 cd
Camomila	2.877 bcd	4.333 de	6.450 d
Capim-limão	0.000 h	0.000 h	3.233 e
Cravo	0.000 h	0.000 h	0.000 e
Funcho	0.617 gh	2.500 g	6.317 d
Gengibre	2.533 de	4.750 cd	7.200 bcd
Goiaba vermelha	3.633 a	5.617 ab	7.617 abcd
Laranja baiana	3.483 ab	5.600 ab	7.850 abc
Lípia	1.250 fg	3.133 fg	6.450 d
Macela	3.350 abc	5.233 bc	7.800 abc
Tagetes	2.633 cde	4.233 de	6.950 cd
CV (%)	19.68	11.68	13.92

¹ Média da medição do diâmetro da colônia de 3 blocos, sendo cada bloco composto por 1 placa. Dados originais. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste DMS a 5% de significância.

TABELA 8 - Crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* em presença de óleos essenciais, *in vitro*.

Óleos essenciais	Crescimento micelial de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> ¹		
	3 dias	5 dias	10 dias
Testemunha (BDA)	3.000 a	5.167 a	9.000 a
Alecrim	1.917 c	4.077 ab	8.317 ab
Alfavaca	0.333 f	1.200 cd	4.067 cd
Camomila	1.883 c	3.227 b	6.167 bcd
Capim-limão	0.000 f	0.000 d	0.000 e
Cravo	0.000 f	0.000 d	0.000 e
Funcho	0.200 f	1.300 cd	3.517 d
Gengibre	0.217 f	0.817 d	3.500 d
Goiaba vermelha	2.370 b	4.177 ab	7.933 ab
Laranja baiana	1.233 de	3.610 b	6.700 abc
Lípia	0.877 e	2.700 bc	7.583 ab
Macela	2.250 bc	4.083 ab	5.583 bcd
Tagetes	1.367 d	3.100 b	7.483 ab
CV (%)	20.82	35.44	30.66

¹ Média da medição do diâmetro da colônia de 4 blocos, sendo cada bloco composto por 1 placa. Dados originais. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste DMS a 5% de significância.

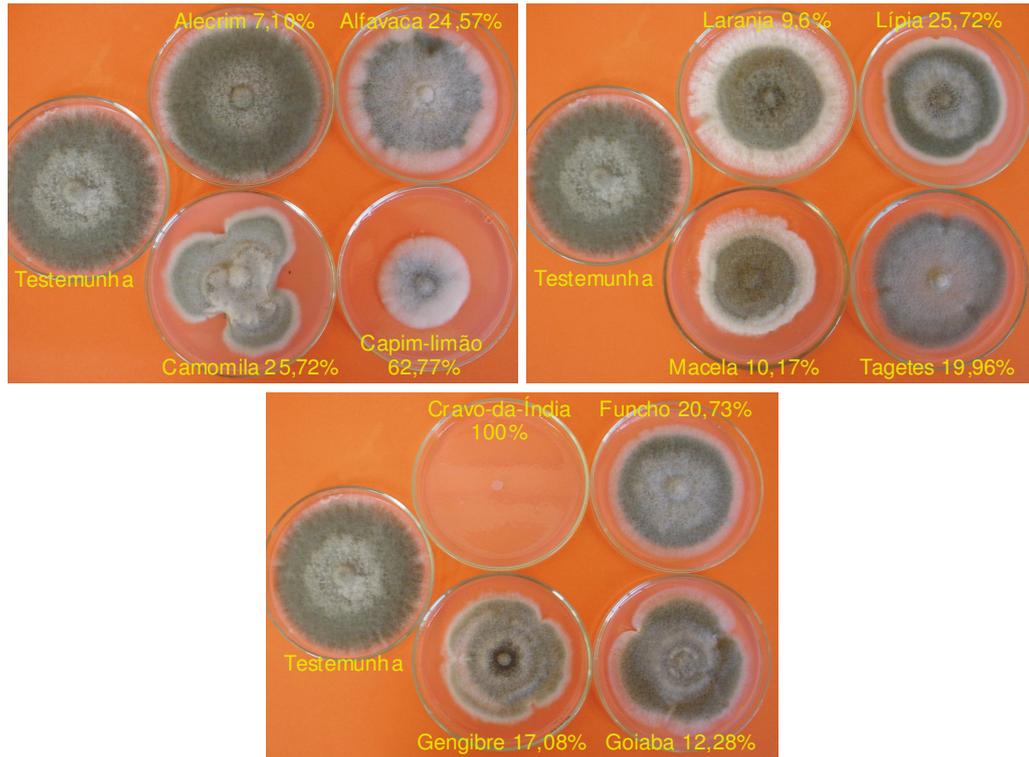


FIGURA - 6 Porcentagem de inibição do crescimento micelial de *Glomerella cingulata* na presença de óleos essenciais em meio BDA, *in vitro*.

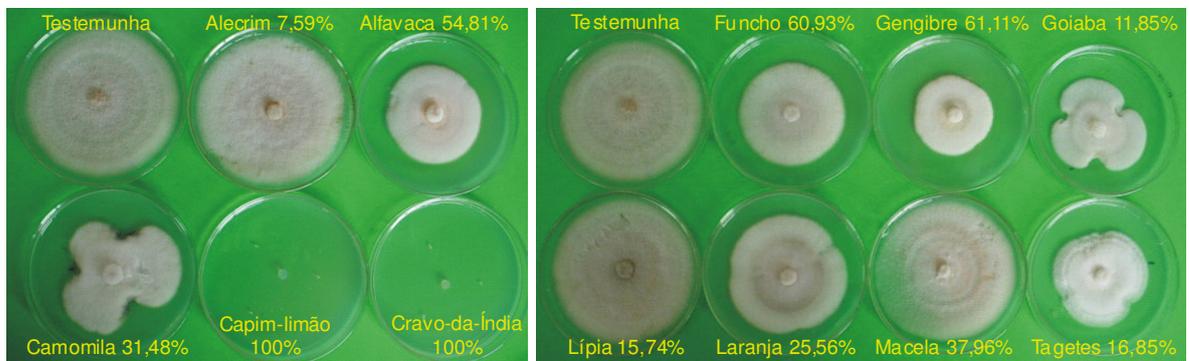


FIGURA 7 - Porcentagem de inibição do crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* na presença de óleos essenciais em meio BDA, *in vitro*.

A complexidade, insolubilidade (em água) e volatilização, dificultam a avaliação da atividade antimicrobiana de óleos essenciais, sendo fundamental a observação da técnica ou método, o meio de cultura para o crescimento do microrganismo, o microrganismo e o óleo essencial (Janssen, 1989).

Devido à possibilidade de não ser homogênea a dispersão do óleo incorporado no meio de cultura no momento de ser vertido, optou-se pela metodologia da distribuição de

alíquotas em três pontos eqüidistantes em meio de cultura BDA. Em conseqüência foi possível avaliar a inibição crescimento micelial do patógeno em relação à presença de compostos voláteis ou fixos com ação fungitóxica.

Diante da complexidade dos óleos essenciais, admite-se que vários mecanismos de ação existem, não conhecidos exatamente, desta forma a inibição de patógenos pode ter ocorrido pela desnaturação de proteínas, inibição de enzimas e/ou desintegração de membranas (Janssen, 1989).

O método proposto para a contagem de esporos, não foi adequado para a metodologia empregada, pois discos foram retirados da parte intermediária entre o disco inicial do patógeno e as alíquotas de óleo, não sendo possível na maioria dos tratamentos observar o contato do micélio com o óleo, exceto quando halos de inibição foram formados. Num primeiro momento podemos afirmar que existe uma redução na esporulação na presença de todos os óleos quando comparados à testemunha, ressaltando 0% de esporulação em presença dos óleos essenciais de cravo e capim-limão.

Mudanças na composição dos óleos essenciais podem influenciar na atividade antimicrobiana, de maneira que sejam tomados cuidados em relação à procedência da material vegetal, origem botânica (alguns óleos comerciais são derivados de diferentes espécies), a colheita sempre observando o horário mais adequado e o estágio de desenvolvimento da planta, a forma de aproveitamento do material (seco ou fresco) e às técnicas de extração.

No processo de extração foi observado o rendimento dos óleos essenciais para se estabelecer um parâmetro sobre a viabilidade econômica de aplicação, dos mesmos, pelo produtor, em caso de inibição do patógeno. O rendimento dos óleos essenciais em mL%, (volume/massa) foi de: alecrim – 1,9%, alfavaca – 1,3%, calêndula – 0,05%, camomila – 0,33%, capim-limão – 0,78%, cravo – 18%, funcho – 0,92%, gengibre – 0,56%, goiaba – 0,38%, laranja – 1%, lípia – 0,35%, macela – 0,30% e tagetes – 0,37%.

4.4.3 Potencial de inibição dos decoctos sobre o crescimento micelial de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides*, *in vitro*

Na avaliação com o isolado 2V₁ correspondente a *Glomerella cingulata* e 4V₁ *Colletotrichum gloeosporioides* observou-se que os decoctos inibiram parcialmente o crescimento micelial dos patógenos, em percentagens inferiores a 50%. Desta forma, os decoctos no controle de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides* apresentaram as seguintes porcentagens de inibição, respectivamente:

Alecrim 38,89% e 42,38%, gengibre 33,33% e 19,04%, calêndula 32,22% e 22,38%, laranja 29,44% e 25,24%, funcho 16,48% e -7,61%, alfavaca 16,30% e -2,85%, macela 12,41% e 20,47%, camomila - 6,67% e 28,10% , testemunha 0% , capim-limão 0% e -10%, goiaba - 0% e 3,57%, lípia 0% e 4,29%, tagetes 0% e 14,29%.

Neste experimento verificou-se a redução do potencial de inibição dos decoctos quando comparados aos extratos aquosos, que evidencia a possível alteração ou perda de substâncias ativas devido ao aquecimento prolongado do método de decocção, mas não a completa degradação dos compostos secundários biologicamente ativos.

Estatisticamente, foi comprovado que não houve degradação total dos compostos secundários biologicamente ativos capazes de exercer atividade antifúngica, pelo aquecimento prolongado (Tabela 9).

TABELA 9 - Crescimento micelial de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides*, *in vitro*, em meio BDA, contendo decoctos.

Extrato aquoso	Crescimento micelial ¹	
	<i>Glomerella cingulata</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
	7 dias	7 dias
Testemunha (BDA)	9.000 a	7.000 abcd
Alecrim	5.500 d	4.033 g
Alfavaca	7.533 abc	7.200 abc
Calêndula	6.133 bcd	5.433 defg
Camomila	8.400 a	5.033 fg
Capim-limão	9.000 a	7.700 a
Funcho	7.533 abc	7.533 ab
Gengibre	6.033 cd	5.667 cdef
Goiaba	9.000 a	6.800 abcde
Laranja	6.433 bcd	5.233 efg
Lípia	9.000 a	6.700 abcde
Macela	7.900 ab	5.567 defg
Tagetes	9.000 a	6.000 bcdef
CV (%)	13.75	15.14

¹ Média da medição do diâmetro da colônia de 3 repetições, sendo cada bloco composto por 1 placa. Dados originais. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste DMS a 5% de significância.

4.4 CONTROLE ALTERNATIVO DE *Colletotrichum gloeosporioides* EM FRUTOS DE GOIABEIRA

O período de pós-colheita é definido como um espaço de tempo indeterminado entre a colheita e o consumo, em que perdas substanciais de produtos podem ocorrer devido às podridões patológicas (Dhingra, 1985). O controle após a colheita tem como objetivos evitar que os patógenos latentes nos tecidos causem podridões e impedir novas infecções (Bettiol & Ghini, 1995).

Estratégias empregadas no controle pós-colheita de doenças abrangem a redução do inóculo, prevenção e erradicação de infecções no campo, inativação de infecções por ferimentos e supressão do desenvolvimento e propagação da doença. Os fungicidas constituem-se na principal medida de controle de doenças em pós-colheita (Eckert e Ogawa, 1985), em consequência desta utilização, são ingeridos diariamente resíduos que podem ser nocivos à saúde, tornando a população vulnerável às infecções e até mesmo ao câncer, e que em muitos casos ocasionam danos irreparáveis ao meio ambiente.

Nos Estados Unidos, captan e benomyl entre outros vários fungicidas foram proibidos pela U.S. Environmental Protection Agency ou retirados voluntariamente do mercado, depois de um relatório elaborado pela National Academy Sciences (NAS, 1987) sobre os riscos à saúde associados ao uso de fungicidas (Wisniewski and Wilson, 1992). No Brasil, tais produtos continuam sendo utilizados.

Segundo Eckert (1991), uma das alternativas para a significativa redução das doenças no produto final se refere à utilização de técnicas não químicas ou fungicidas não seletivos como carbonato de sódio, bicarbonato de sódio, cloro ativo e ácido sórbico.

Neste contexto, optou-se pela avaliação de adubos foliares, ativadores de plantas, óleos essenciais e extrato aquoso para atender a exigência dos mercados importadores de frutas do Brasil em relação à ausência de resíduos de agrotóxicos, evidenciando-se a urgência do desenvolvimento de novos e efetivos métodos de controle de doenças em pós-colheita.

A eficiência dos produtos avaliados neste experimento poderia ser questionada devido aos tratamentos fitossanitários realizados na cultura. No entanto, através da utilização de testemunhas não tratadas, nem inoculadas, foi observada alta incidência de antracnose nos frutos, demonstrando que existem problemas nos métodos de controle, como aplicação dos fungicidas em épocas inadequadas, dosagens incorretas, resistência do patógeno aos produtos, entre outros.

O ideal seria o contato direto com produtores, de maneira que fosse possível o acompanhamento de todas as fases do desenvolvimento da cultura, bem como dos tratamentos fitossanitários e práticas culturais.

Para a eficiência do controle em pós-colheita, estratégias devem ser estabelecidas com base no processo de maturação, levando-se em conta que a conservação da goiaba é de poucas semanas (Tandon and Singh, 1989).

Por tratar-se de uma fruta climatérica (Brown and Wills, 1983), a goiaba apresenta durante o processo de maturação, um pico de atividade respiratória, denominado de respiração climatérica (Tucker, 1993). O pico de CO₂ e etileno ocorre 5 a 6 dias após a

colheita (Adsule and Kadam, 1995). Em espécies de *Colletotrichum*, a germinação de conídios é desencadeada por ceras e etileno, produzidos pela planta hospedeira (Osheroov and May, 2001).

Nas Tabelas 10 e 11, estão os resultados da avaliação de incidência de antracnose, em fermentos em goiabas, variedade Paluma (polpa vermelha) e Iwao (polpa branca).

TABELA 10 - Incidência de antracnose, em fermentos em goiabas variedade Paluma (polpa vermelha), tratados em pós-colheita.

Tratamentos	Números de fermentos com infecção de antracnose ¹	
	6 dias	8 dias
Testemunha inoculada	1.915 a	4.00 a
Fosfito K	1.418 ab	3.67 ab
Fosfito CaB	1.418 ab	3.67 ab
Bion 500 WG	0.165 b	3.67 ab
Óleo de Capim-limão	1.085 ab	3.33 ab
Ecolife	0.918 ab	3.00 bc
Óleo de Cravo	0.748 ab	3.00 bc
Extrato de Cravo	0.665 ab	1.67 d
CV (%)	81.03	14.48

¹ Média de 4 blocos, sendo cada bloco composto por 3 frutos com 4 fermentos/fruto totalizando 12 frutos e 48 fermentos. Dados originais. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste DMS a 5% de significância.

O extrato de cravo a 2,5% apresentou-se como o tratamento mais eficiente, estatisticamente, no controle da antracnose em goiabas da variedade Paluma (polpa vermelha), aos 8 dias.

Os óleos essenciais de cravo e capim-limão não demonstraram eficiência no controle do patógeno igualando-se a testemunha inoculada, embora tenham inibido completamente o crescimento micelial do patógeno em experimento realizado *in vitro*.

TABELA 11 - Incidência de antracnose, em fermentos em goiabas variedade Iwao (polpa branca), tratados em pós-colheita.

Tratamentos	Números de fermentos com infecção de antracnose ¹	
	6 dias	8 dias
Testemunha inoculada	2.250 a	2.918 a
Fosfito K	1.335 ab	2.165 ab
Fosfito CaB	1.418 ab	2.250 ab
Óleo de Capim-limão	1.355 ab	2.253 ab
Ecolife	1.418 ab	2.247 ab
Óleo de Cravo	0.583 b	1.250 b
CV (%)	62.67	48.34

¹ Média de 4 blocos, sendo cada bloco composto por 3 frutos com 4 fermentos/fruto totalizando 12 frutos e 48 fermentos. Dados originais. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste DMS a 5% de significância.

O tempo de imersão pode ter sido insuficiente para a absorção e translocação dos fosfitos de K e CaB e para os ativadores Bion e Ecolife, não sendo estatisticamente demonstrados como tratamentos eficientes.

Ecolife tem ação sinérgica, melhorando o vigor e a resitência das plantas as doenças. Sua ação é comandada pelos bioflavonóides cítricos (vitamina P), fitoalexinas cítricas e ácido ascórbico (vitamina C). Os tecidos das plantas são induzidos a sintetizar suas próprias fitoalexinas, que a planta utiliza para reduzir os danos causados por bactérias e fungos.

BION 500 WG é um ativador de plantas e não tem ação direta contra os patógenos. Devido às suas características, o produto é indicado para o Manejo Integrado de Doenças. Aplicado na parte aérea das plantas, ele ativa os seus próprios mecanismos naturais de defesa e aumenta sua resistência às doenças. Devido ao seu modo de ação particular, o produto deve ser aplicado antes da entrada dos patógenos, de forma preventiva. O produto é rapidamente absorvido pelos tecidos foliares e se transloca sistemicamente, tanto para as folhas quanto para as raízes, ativando assim a planta de forma generalizada. Agrotóxico da Classe Toxicológica: medianamente tóxico é composto por Éster S-metílico do ácido 1,2,3-benzotiadiazol-7-carbotióico (ACIBENZOLAR-S-METHYL), liberado com restrição de uso no Paraná estando liberado somente para *Alternaria solani* e *Xanthomonas campestris* na cultura do tomate.

Em verificação prévia constatou-se que os fosfitos e os ativadores não apresentam ação inibidora sobre o crescimento micelial do patógeno. Desta forma, a perspectiva é de que tais produtos sejam eficientes quando utilizados em pré-colheita para indução de resistência.

Os óleos essenciais de cravo e capim-limão pela volatilização de algum composto ou pelo contato com os frutos provocaram alteração fisiológica na casca. Em experimento prévio, os óleos essenciais foram testados em câmara úmida, com adição de 100 µL de óleo distribuídos em quatro pontos equidistantes na parte superior da embalagem com papel de filtro umedecido e, mantida fechada, observando-se então a alteração da casca do fruto na porção voltada para cima (Figura 8a).

Neste experimento, a quantidade de óleo foi reduzida para 10 µL, sendo depositada na parte inferior da embalagem em algodão e novamente ocorreu a “queima do fruto”, porém de forma inferior (Figura 8b).



FIGURA 8 - Alteração fisiológica decorrente da utilização de óleos essenciais.

4.6 GERMINAÇÃO E FORMAÇÃO DE APRESSÓRIO DE *Colletotrichum gloeosporioides* EM MEMBRANA DE POLIESTIRENO

A formação de apressórios foi observada na testemunha, numa percentagem de 4%. No extrato de cravo-da-Índia, 100% dos esporos não germinaram e nem formaram apressórios. Nos demais extratos não foi possível fazer avaliação devido ao intenso crescimento micelial. Assim, cuidados como determinação da concentração de conídios/mL, tempo ideal para a germinação e formação de apressórios, temperatura, fotoperíodo, adição de dextrose nos tratamentos e testemunha, entre outros, devem ser tomados.

5 CONCLUSÃO

A inibição total ou parcial do crescimento micelial de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides*, observada *in vitro*, pelos extratos aquosos e óleos essenciais obtidos a partir de plantas medicinais, indica a existência de compostos com ação fungitóxica que possibilitarão o emprego destas no controle alternativo da antracnose em frutos de goiabeira.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O controle alternativo da antracnose em frutos de goiabeira propicia a demanda de muitas outras pesquisas, tanto para a cultura da goiabeira quanto para o cultivo de plantas medicinais.

O monitoramento de infecção latente é fundamental, pois com o conhecimento da época e do mecanismo de infecção dos patógenos, estratégias eficientes de controle podem ser definidas para o controle e/ou erradicação de infecções latentes e ativas .

O potencial das plantas medicinais no controle de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides*, neste trabalho, foi determinado pela inibição do crescimento micelial caracterizando a ação fungitóxica de alguns compostos. A partir destes resultados, sugere-se a avaliação destas plantas na indução de fitoalexinas e o potencial de inibição do desenvolvimento do fungo pela presença de compostos com características de elicitores, ou seja compostos com a capacidade de ativar ou induzir qualquer resposta de defesa nos frutos.

Para as atividades de fitorreguladores e produtos biológicos, agroquímicos recomendados pelo sistema de produção integrada de frutas, no controle de fitopatógenos, avaliações são necessárias.

O fracionamento dos metabólitos secundários e a determinação da atividade biológica das moléculas para maior esclarecimento sobre a ação fungitóxica podem direcionar a pesquisa e dar maior confiabilidade aos resultados.

Os fosfitos, os ativadores de plantas e extrato aquoso de cravo devem ser testados a campo, em vários ciclos da cultura. No controle alternativo em frutos de goiabeira, os adubos foliares, ativadores de plantas, óleos essenciais e extrato aquoso de cravo-da-Índia devem ser reavaliados em dosagens e tempos de imersão diferentes.

Os óleos essenciais poderão ser testados em embalagens e câmaras, devido à volatilização de alguns compostos, que podem alterar a composição da atmosfera local e causar a inibição de fungos em pós-colheita.

A conscientização dos produtores em relação às vantagens da Produção Integrada de Frutas e do Programa Brasileiro para a Modernização da Horticultura é primordial para a produção de frutas com qualidade certificada e manutenção das funções: social, produtiva e ambiental da agricultura.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADSULE, R. N.; KADAM, S.S. **Guava**. Cap. 19. In: SALUNKHE, D.K. and KADAM, S.S. **Handbook of Fruit Science and Technology: Production, Composition, Storage, and Processing**. Marcel Dekker, Inc., New York. 1995. 611 pp.

ALMEIDA, J. G. F. **Barreira às exportações de frutas tropicais**. Fitopatologia Brasileira 27, Brasília, Suplemento, p. S7-S10, 2002.

AMORIM, L. **Colonização e reprodução**. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.) Manual de Fitopatologia: Princípios e conceitos. 3 ed., v.1. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995, 919p.

AMORIM, L. **Ciclos primário e secundário**. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.) Manual de Fitopatologia: Princípios e conceitos. 3 ed., v.1. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995, 919p.

BEDENDO, I. P. **Podridão de órgãos de reserva**. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.) Manual de Fitopatologia: Princípios e conceitos. 3 ed., v.1. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995, 919p.

BETTIOL, W.; GHINI, R. **Controle biológico**. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.) Manual de Fitopatologia. Princípios e conceitos. 3 ed., v.1. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995, 919p.

Boletim IOBC/WPRS, 1999. In: **Marco legal da produção integrada de frutas do Brasil /** Organizado por José Rosalvo Andrigueto e Adilson Reinaldo Kososki. – Brasília: MAPA/SARC, 2002. p. 3. ???60 p.: il. color.

Boletim Informativo 707. FAEP – Federação da agricultura do Estado do Paraná.

CARDOSO FILHO, J.A. **Efeito de extratos do albedo de *Citrus sinensis* na germinação, formação de apressórios e crescimento micelial de *Phyllosticta citricarpa* in vitro**. In: Efeito de extratos de albedo de laranja (*Citrus sinensis*) e dos indutores de resistência ácido salicílico, acilbenzolar-s-metil e *Saccharomyces cerevisiae* no controle de *Phyllosticta citricarpa* (teleomorfo: *Guignardia citricarpa*). (Tese de Doutorado). Piracicaba. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo. 2003.

CARVALHO, V. D. de. **Qualidade e conservação pós-colheita de goiabas**. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v. 17, n. 179, p. 48-54, 1994.

CORRÊA JÚNIOR, C., MING, L.C. & SCHEFFER, C.M. **Cultivo de Plantas Medicinais, Condimentares e Aromáticas**. Curitiba, EMATER-Paraná, 1991. 151 p.

CUNICO, M.M.; MIGUEL, O.G.; MIGUEL, M.D.; CARVALHO, J.L.S.; PEITZ, C.; AUER, C.G.; GRIGOLETTI JÚNIOR, A. **Estudo da atividade antifúngica de *Ottonia martiana* Miq., Piperaceae: um teste in vivo**. Visão Acadêmica, Curitiba, v.4, n.2, p.77-82, Jul.- Dez./2003.

DHINGRA, O.D. **Patologia pós-colheita**. Informe Agropecuário, Belo Horizonte 11(122) fevereiro de 1985.

ECKERT, J.W.; OGAWA, J.M. **The chemical control of postharvest diseases: subtropical and tropical fruits.** Annual Review of Phytopathology. 1985. 23:421-454.

FALKENBERG, M. B.; SANTOS, R. I.; SIMÕES, C. M. O. **Introdução à análise fitoquímica.** Cap.10. In: Farmacognosia: da planta ao medicamento/organizado por Cláudia Maria de Oliveira Simões, Eloir Paulo Schenkel, Grace Gossmann, João Carlos Palazzo de Mello, Lílian Auler Mentz & Pedro Ros Petrovick. – 2.ed.ver. – Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS. Ed. da UFSC, 2000.

FRENCH, R. C. **Volatile chemical germination stimulators of rust and other fungal spores.** Mycologia. 84(3). 1992. pp. 277-288.

FRUPEX. **Goiaba para Exportação: Procedimentos de Colheita e Pós-Colheita.** Ministério da Agricultura, Abastecimento e Reforma Agrária/ Secretaria De Desenvolvimento Rural – SDR. Programa de Apoio à Produção e Exportação de Frutas, Hortaliças, Flores e Plantas Ornamentais – FRUPEX. Embrapa – SPI. Brasília, DF - 1996.

GHINI, R.; KIMATI, H. **Resistência de fungos a fungicidas.** Jaguariúna, SP: Embrapa Meio Ambiente, 2002. 78p,Il., 22 cm

GONZAGA NETO, L. **Cultura da goiabeira.** Petrolina, PE: EMBRAPA-CPATSA, 1990. p. 8 (EMBRAPA-CPATSA, Circular Técnica, 23).

GUCHTAIN, O. S. **Coletânea sobre a Camomila Alemã (*Matricaria recutita* Linné, Asteraceae).** Monografia. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2002. 113p.

GUTIERREZ, A. de S. D. **O Negócio De Frutas Frescas.** Disponível em: <http://www.iea.sp.gov.br/out/verTexto.php?codTexto=563>. Acesso em 12/02/2000.

HATSCHBACH, L.C. **Selo de qualidade.** Revista CREA-PR, Curitiba, n. 9, p. 5, 2000.

<http://www.sebraemg.com.br/arquivos/programaseprojetos/agronegocios/Fructicultura/Cap4.doc>.

<http://www.irrigar.org.br/pademb/?fr=goi&tipo=fr&new=2>.

JUNQUEIRA, N. T. V. **Doenças e pragas.** Cap. 9. In: Fruticultura Tropical: 6. Goiaba. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2000.

JANSSEN, A.M. **Antimicrobial Activities of Essential Oils** –A Pharmacognostical Study – In: ÓLEOS ESSENCIAIS - Potencial anti-inflamatório. SIANI, A. C., SAMPAIO, A. L. F., SOUSA, M. C. de, HENRIQUES, M. das G. M. O. & RAMOS, M. F. de. Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, ano 3, número 16 - setembro/outubro 2000.

KIMATI, H. **Controle químico.** In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (ed.) Manual de Fitopatologia. Princípios e conceitos. 3 ed., v.1. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. 919p.

KOLLER, O. C. **Cultura da goiabeira.** Porto Alegre: Agropecuária, 1979. 44p. In: GONZAGA NETO, L. Cultura da goiabeira. Petrolina, PE: EMBRAPA-CPATSA, 1990. p. 8 (EMBRAPA-CPATSA, Circular Técnica, 23).

KRUGNER, T. L.; BACCHI, L. M. A. **Fungos**. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.) Manual de Fitopatologia. Princípios e conceitos. 3 ed., v.1. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995, 919p.

LEITE, B.; NICHOLSON, R.L. **Mycosporine-alanine a self-inhibitor of germination from conidial mucilage of *Colletotrichum graminicola***. Experimental Mycology, v.16, n.1, p.76-86, 1992.

MANICA, I. **Fruticultura Tropical: 6. Goiaba**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2000.

MENEZES, M. **Aspectos biológicos e taxonômicos de espécies do gênero *Colletotrichum***. Fitopatologia Brasileira 27, Brasília, Suplemento, p. S23-S24, 2002.

MING, L. C. **Estudo e pesquisa de plantas medicinais na agronomia**. Horticultura Brasileira, 12 (1), maio de 1994.

NAKA, J. **Produção integrada da fruticultura**. In: Agroverde Informe – CLAES. Disponível em: <<http://www.ambiental.net/agroverde/Produc%20Integrada%20Frutas.htm>> Acesso em 20/06/2001.

OCHSE, J. J.; SOULE JUNIOR; DIJKMEN, M.J.; WEHLBUG, C. **Tropical and subtropical agriculture**. New York: MacMillan, 1966. In: GONZAGA NETO, L. Cultura da goiabeira. Petrolina, PE: EMBRAPA-CPATSA, 1990. p. 8 (EMBRAPA-CPATSA, Circular Técnica, 23)

OSHEROV, N.; MAY, G.S. **The molecular mechanisms of conidial germination**. Microbiology, v.30, 153-160. 2001.

PERFECT, S. E.; HUGHES, H. B.; O'CONNELL, R. J.; GREEN, J. R. ***Colletotrichum*: A model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions**. Fungal Genetics and Biology 27, 186-198 (1999)

POSER, G. L. von; MENTZ, L. A. **Diversidade biológica e sistemas de classificação**. Cap.4. In: Farmacognosia: da planta ao medicamento/organizado por Cláudia Maria de Oliveira Simões, Eloir Paulo Schenkel, Grace Gossmann, João Carlos Palazzo de Mello, Lílian Auler Mentz & Pedro Ros Petrovick. – 2.ed.ver. – Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS. Ed. da UFSC, 2000.

PRATINI DE MORAES, M.V. **Apresentação**. In: ANDRIGUETO, J.R. Marco legal da produção integrada de frutas do Brasil / Organizado por José Rozalvo Andrigueto e Adilson Reinaldo Kososki. - Brasília: MAPA/SARC, 2002. p. 3. 60 p. : il. color.

RUEHLE, G. D. **El cultivo de la guayaba em la Flórida. Agriculture Tropical**. v.20, n.10, p.555-564, 1964. In: GONZAGA NETO, L. Cultura da goiabeira. Petrolina, PE: EMBRAPA-CPATSA, 1990. p. 8 (EMBRAPA-CPATSA, Circular Técnica, 23)

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. **Óleos voláteis**. Cap.18. In: Farmacognosia: da planta ao medicamento/organizado por Cláudia Maria de Oliveira Simões, Eloir Paulo Schenkel, Grace Gossmann, João Carlos Palazzo de Mello, Lílian Auler Mentz & Pedro Ros Petrovick. – 2.ed.ver. – Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS?Ed. da UFSC, 2000.

PLETSCH, M. **Compostos Naturais biologicamente ativos. A aplicação da biotecnologia à produção de compostos naturais biologicamente ativos**. Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, ano 1, número 4 - janeiro/fevereiro 1998.

RIBEIRO, L.F. & BEDENDO, I.P. **Efeito inibitório de extratos vegetais sobre *Colletotrichum gloeosporioides* - agente causal da podridão de frutos de mamoeiro.** *Scientia agricola*, 1999, vol.56, n.4, Suplemento, p.1267-1271. ISSN 0103-9016.

SALGADO, A.P.S.P.; 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*, Lavras. v.27, n.2, p.249-254, mar/abr, 2003.

SALUNKHE, D.K. and KADAM, S.S. **Handbook of Fruit Science and Technology: Production, Composition, Storage, and Processing.** Marcel Dekker, Inc., New York. 1995. 611 pp.

SANHUEZA, R. M. V. **História da Produção Integrada de Frutas no Brasil.** Disponível em: <http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos/historia.html>. Acesso em 22/11/2001.

SANTOS, M. F. B. dos. **Efeito de extratos de duas formas de *Lippia alba* sobre o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (PENZ.) isolado de *Citrus* sp.** (Dissertação de Mestrado). Piracicaba. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo. 1996.

SILVEIRA, V.D. **Micologia I.** 4 ed., Rio de Janeiro: Ed. Interamericana, 1981, 332 p.

SOUBIHE SOBRINHO, J. **Estudos básicos para o melhoramento da goiabeira (*Psidium guajava* L.).** ESALQ, 1951, 166p. Tese Doutorado. In: GONZAGA NETO, L. *Cultura da goiabeira*. Petrolina, PE: EMBRAPA-CPATSA, 1990. p. 8 (EMBRAPA-CPATSA, Circular Técnica, 23)

SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; CRUZ, M. E. da S. **Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos.** *Floresta*, v.30, n.1 e 2, p.129-137, jun e dez/2000.

STANGARLIN, J.R.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; CRUZ, M.E. da S; NOZAKI, M.H. **Plantas medicinais. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos.** *Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, ano 2, número 11 - novembro/dezembro 1999.

TESKE, M. & TRENTINI, A.M..M. **Herbarium Compêndio de Fitoterapia.** 3ed., Curitiba, ed. e publ. por Herbarium Laboratório Botânico, 1997.

USP, XXII, 1990 THE UNITED STATES PHARMACOPOEIA. 22nd ed. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention, 1990.

WISNIEWSKI, M.E.; WILSON, C.L. **Biological Control of Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables: Recent Advances.** *Hortscience*, vol. 27(2), fevereiro 1992.