

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS**

**CARACTERIZAÇÃO E SENSIBILIDADE DE *Colletotrichum* spp.  
ISOLADO DE *Vitis labrusca* A ÓLEOS ESSENCIAIS**

**SUELEN PIETA SMANIOTTO**

**DOURADOS  
MATO GROSSO DO SUL  
2022**

**CARACTERIZAÇÃO E SENSIBILIDADE DE *Colletotrichum* spp.  
ISOLADO DE *Vitis labrusca* A ÓLEOS ESSENCIAIS**

SUELEN PIETA SMANIOTTO  
Engenheira Agrônoma

Orientadora: PROF. DR<sup>a</sup>. LILIAN MARIA ARRUDA BACCHI

Co-orientadora: PROF. DR<sup>a</sup>. NATASHA AKEMI HAMADA

Tese apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal, para obtenção do título de Doutor.

Dourados  
Mato Grosso do Sul  
2022

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).**

S635c	<p>Smaniotto, Suelen Pieta. Caracterização e sensibilidade de <i>Colletotrichum</i> spp. isolado de <i>Vitis labrusca</i> a óleos essenciais. / Suelen Pieta Smaniotto. – Dourados, MS : UFGD, 2022.</p> <p>Orientadora: Prof. Lilian Maria Arruda Bacchi. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal da Grande Dourados.</p> <p>1. Óleos voláteis. 2. <i>Colletotrichum</i> spp. 3. <i>Elsinoe ampelina</i>. 4. Eugenol. 5. Eucaliptol. 6. Cinamaldeído. I. Título.</p>
-------	--

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD.**

**©Todos os direitos reservados. Permitido a publicação parcial desde que citada a fonte.**

**CARACTERIZAÇÃO E SENSIBILIDADE DE *Colletotrichum* spp.  
ISOLADO DE *Vitis labrusca* A ÓLEOS ESSENCIAIS**

por

Suelen Pieta Smaniotto

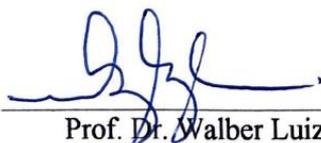
Tese apresentada como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de  
DOUTORA EM AGRONOMIA.

Aprovado em: 05/07/2022



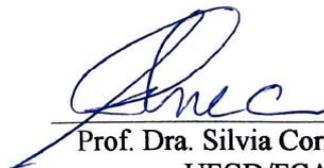
---

Prof. Dra. Lilian Maria Arruda Bacchi  
Orientadora - UFGD/FCA



---

Prof. Dr. Walber Luiz Gavassoni  
UFGD/FCA



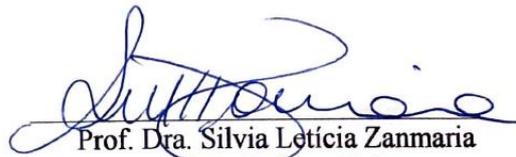
---

Prof. Dra. Silvia Correa Santos  
UFGD/FCA



---

Dr. Heber Ferreira dos Reis  
AGRAER/MS



---

Prof. Dra. Silvia Leticia Zanmaria  
IFPR-Campus Palmas

A minha filha Helena

A minha mãe Silvia

Meu esposo Ricardo

Meus avós Loivi, Mauricio, Edite e Pedro

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por estar sempre comigo, me abençoando todos os dias, iluminando e guiando meu caminho, dando forças para seguir em frente.

À Universidade Federal da Grande Dourados, pela oportunidade de realização desta pesquisa.

Ao Instituto Federal do Paraná- Campus Palmas pelo acordo de cooperação técnica e possibilidade de realizar a parte experimental deste estudo.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pelo apoio financeiro e científico.

À minha orientadora Prof. Dr<sup>a</sup> Lilian Maria Arruda Bacchi pela sua orientação, confiança, compreensão, oportunidade e amizade.

À Prof. Dr<sup>a</sup> Natasha Akemi Hamada, pela co-orientação, confiança, apoio e amizade.

Ao Adriano Rissardi pelo auxílio e amparo nas visitas aos vinhedos.

Aos produtores de uva, por disponibilizarem suas propriedades e permitirem a coleta dos materiais vegetais.

Ao Dr. Heber Ferreira dos Reis, pelo auxílio nas coletas dos materiais vegetais.

À minha filha Helena por todo seu amor.

À meu esposo Ricardo, por sempre estar ao meu lado me apoiando, incentivando e auxiliando nos ensaios. Por todo seu amor e compreensão.

A minha mãe Silvia, que sempre me ajudou na caminhada, pelo seu amor incondicional, apoio e incentivo constante.

A meu pai Elton pelo incentivo e carinho.

Aos meus avós Pedro, Edite, Mauricio e Loivi, por todos os ensinamentos e conselhos.

As técnicas de laboratório do Instituto Federal do Paraná-Campus Palmas, Cledes e Simone, pelo apoio e auxílio nos experimentos.

Aos meus colaboradores e grandes amigos, Matheus, Ana Carolina e Francine pela amizade, companheirismo, ideias, disposição e colaboração nas atividades desenvolvidas no laboratório.

À Vera, Marisa, Saionara e Dionara, pessoas especiais, que me auxiliaram nos cuidados com minha filha Helena nos momentos que precisei me ausentar.

Agradeço aos membros da banca examinadora pela disponibilidade em participar neste momento tão importante de minha vida.

E a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho pudesse ser realizado.

## SUMÁRIO

### PÁGINA

RESUMO .....	VI
ABSTRACT .....	VII
1 INTRODUÇÃO.....	5
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	7
2.1 Panorama da viticultura brasileira .....	7
2.2 <i>Colletotrichum</i> spp. em videira .....	10
2.2.1 Antracnose da videira .....	10
2.2.2 Podridão da uva madura .....	11
2.2.3 Controle .....	13
2.3 Óleos essenciais.....	15
2.3.1 Óleo essencial de cravo-da-índia ( <i>Syzygium aromaticum</i> [L] Merr. et Perry). e composto eugenol.....	17
2.3.2 Óleo essencial de canela ( <i>Cinnamomum cassia</i> ) e composto cinamaldeído .....	19
2.3.3 Óleo essencial de eucalipto ( <i>Eucalyptus globulus</i> Labill) e composto eucaliptol. 20	
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1 Obtenção dos isolados .....	22
3.2 Obtenção de culturas monospóricas .....	23
3.3 Caracterização cultural e morfológica de isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. como agente causal de doença em videira .....	24
3.4 Teste de patogenicidade.....	25
3.4.1 Preparo do inóculo.....	25
3.4.2 Patogenicidade em folhas destacadas de videira .....	26
3.4.3 Patogenicidade em frutos.....	27
3.5 Atividade antifúngica de óleos essenciais e compostos majoritários sobre os isolados .....	27
3.5.1 Avaliação da eficácia de óleos essenciais de cravo e canela no controle <i>in vitro</i> de <i>Colletotrichum</i> spp. ....	29
3.5.2 Avaliação da eficácia do óleo essencial de eucalipto no controle <i>in vitro</i> de <i>Colletotrichum</i> spp. ....	30

3.5.3 Avaliação da eficácia dos compostos eugenol e cinamaldeído no controle <i>in vitro</i> de <i>Colletotrichum</i> spp.....	30
3.5.4 Avaliação da eficácia do composto eucaliptol no controle <i>in vitro</i> de <i>Colletotrichum</i> spp.....	30
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	31
4.1 Culturas monospóricas .....	31
4.2 Caracterização cultural e morfológica de isolados provenientes de videiras, cultivar Niágara rosada, de diferentes regiões do Mato Grosso do Sul, Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina .....	31
4.3 Teste de patogenicidade em folhas e bagas .....	48
4.4 Atividade antifúngica de óleos essenciais e compostos majoritários sobre os isolados de <i>Colletotrichum</i> spp.....	52
4.4.1 Avaliação da eficácia de óleos essenciais de cravo e canela no controle <i>in vitro</i> de <i>Colletotrichum</i> spp. ....	52
4.4.2 Avaliação da eficácia do óleo essencial de eucalipto no controle <i>in vitro</i> de <i>Colletotrichum</i> spp. ....	59
4.4.3 Avaliação da eficácia dos compostos eugenol e cinamaldeído no controle <i>in vitro</i> de <i>Colletotrichum</i> spp.....	62
4.4.4 Avaliação da eficácia do composto eucaliptol no controle <i>in vitro</i> de <i>Colletotrichum</i> spp.....	67
5 CONCLUSÕES .....	72
REFERÊNCIAS .....	73
ANEXOS .....	86

## LISTA DE QUADROS

PÁGINA

QUADRO 1. Composição química do óleo essencial de folhas e botões de cravo (*Eugenia caryophyllus*). ..... 28

QUADRO 2. Composição química do óleo essencial de folhas e galhos de eucalipto (*Eucalyptus globulus*). ..... 28

QUADRO 3. Designação, origem geográfica, órgão de isolamento e ano/mês de coleta dos isolados fúngicos de videiras (*Vitis labrusca*) com sintomas de antracnose provenientes dos Estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Dourados-MS, UFGD, 2022. .... 32

QUADRO 4. Designação, origem geográfica, órgão de isolamento e ano/mês de coleta dos isolados fúngicos de videiras (*Vitis labrusca*) com sintomas de antracnose provenientes do Estado do Mato Grosso do Sul. Dourados-MS, UFGD, 2022. .... 33

QUADRO 5. Características culturais de isolados fúngicos obtidos de videiras (*Vitis labrusca*) com sintomas de antracnose provenientes dos Estados do Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina. Dourados-MS, UFGD, 2022. .... 34

QUADRO 6. Características culturais de isolados de isolados de videiras (*Vitis labrusca*) com sintomas de antracnose e provenientes do Estado do Mato Grosso do Sul. Dourados-MS, UFGD, 2022. .... 36

QUADRO 7. Diâmetro final da colônia (DFC) e índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) de isolados de videiras (*Vitis labrusca*) provenientes dos Estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul com sintomas de antracnose. Dourados-MS, UFGD, 2022. .... 43

QUADRO 8. Características morfológicas dos conídios produzidos pelos isolados de videiras (*Vitis labrusca*) com sintomas de antracnose e provenientes dos Estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Dourados-MS, UFGD, 2022. .... 44

QUADRO 9. Diâmetro final da colônia (DFC) e índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) de isolados de videiras (*Vitis labrusca*) provenientes do Estado do Mato Grosso do Sul. Dourados-MS, UFGD, 2022. .... 45

QUADRO 10. Características morfológicas dos conídios produzidos pelos isolados de videiras (*Vitis labrusca*) com sintomas de antracnose e provenientes do Estado do Mato Grosso do Sul. Dourados-MS, UFGD, 2022. .... 46

QUADRO 11. Severidade (%) e área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD) em folhas destacadas da cultivar Niágara Rosada, inoculados com diferentes isolados. Dourados-MS, UFGD, 2022.....	50
QUADRO 12. Diâmetro da lesão e área lesionada em bagas da cultivar Niágara Rosada inoculadas com isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. Dourados-MS, UFGD, 2022.....	52
QUADRO 13. Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) de isolados do fungo <i>Colletotrichum</i> spp. sob influência de diferentes concentrações de óleos essenciais de cravo ( <i>Eugenia caryophyllus</i> ) e canela ( <i>Cinnamomum cassia</i> ). Dourados-MS, UFGD, 2022.....	54
QUADRO 14. Porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) de isolados do fungo <i>Colletotrichum</i> spp. sob influência de diferentes concentrações de óleos essenciais de cravo ( <i>Eugenia caryophyllus</i> ) e canela ( <i>Cinnamomum cassia</i> ). Dourados-MS, UFGD, 2022.....	55
QUADRO 15. Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) de isolados do fungo <i>Colletotrichum</i> spp. sob influência de diferentes concentrações do óleo essencial de eucalipto ( <i>Eucalyptus globulus</i> ). Dourados-MS, UFGD, 2022.....	59
QUADRO 16. Porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) de isolados do fungo <i>Colletotrichum</i> spp. sob influência de diferentes concentrações do óleo essencial de eucalipto ( <i>Eucalyptus globulus</i> ). Dourados-MS, UFGD, 2022.....	60
QUADRO 17. Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) de isolados do fungo <i>Colletotrichum</i> spp. sob influência de diferentes concentrações de eugenol e cinamaldeído. Dourados-MS, UFGD, 2022.....	63
QUADRO 18. Porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) de isolados do fungo <i>Colletotrichum</i> spp. sob influência de diferentes concentrações de eugenol e cinamaldeído. Dourados-MS, UFGD, 2022.....	64
QUADRO 19. Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) de isolados do fungo <i>Colletotrichum</i> spp. sob influência de diferentes concentrações de eucaliptol. Dourados-MS, UFGD, 2022.....	68
QUADRO 20. Porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) de isolados do fungo <i>Colletotrichum</i> spp. sob influência de diferentes concentrações de eucaliptol. Dourados-MS, UFGD, 2022.....	69

## LISTA DE FIGURAS

PÁGINA

FIGURA 1. Ciclo da antracnose da videira. Fonte: SÔNEGO et al., 2003.....	11
FIGURA 2. Ciclo de vida do fungo <i>Glomerella cingulata</i> na uva. Fonte: GARRIDO e SÔNEGO, 2004.....	12
FIGURA 3. Sintomas típicos de antracnose da videira. Dourados-MS, UFGD, 2022. .	22
FIGURA 4. Municípios dos estados Rio Grande do Sul (RS), Paraná (PR), Santa Catarina (SC) e Mato Grosso do Sul (MS) onde foram coletadas amostras de tecidos vegetais com sintomas ou sinais típicos de antracnose. Dourados-MS, UFGD, 2022.....	23
FIGURA 5. Coloração das colônias (anverso e verso) e formatos de conídios de grupos de <i>Colletotrichum</i> spp. isolados de videiras ( <i>Vitis labrusca</i> ) com sintomas de antracnose provenientes dos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Dourados-MS, UFGD, 2022. (...continua...)	37
FIGURA 6. Coloração das colônias (anverso e verso) e formatos de conídios de grupos de <i>Colletotrichum</i> spp. isolados de videiras ( <i>Vitis labrusca</i> ) com sintomas de antracnose provenientes do estado do Mato Grosso do Sul. Dourados-MS, UFGD, 2022. ....	39
FIGURA 7. Diferentes formas de conídios observados nos isolados de videiras ( <i>Vitis labrusca</i> ) com sintomas de antracnose, provenientes dos Estados do Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Mato Grosso do Sul: (A) oblongos, reto, com ápices arredondados; (B) cilíndrico, retos, ápices arredondados; (C) fusiforme, reto, com ápices afinados; (D) elipsoide, extremidades estreitas; (E) clavado, reto, uma extremidade arredondada e outra afinada. Dourados-MS, UFGD, 2022. ....	42
FIGURA 8. Sintomas em folhas de videira da cultivar Niágara rosada, inoculadas com o isolado RS1F1R2 aos 3 (A) e 12 (B) dias após a inoculação. Dourados-MS, UFGD, 2022. ....	49
FIGURA 9. Sintomas em folha de videira da cultivar Niágara rosada, com formação de acérvulos, 15 dias após a inoculação com o isolado o RS1F5R1. Dourados-MS, UFGD, 2022. ....	49
FIGURA 10. Sintomas em bagas da cultivar Niágara rosada, com 6 (A) e 9 (B) dias após a inoculação. Dourados-MS, UFGD, 2022. ....	51

## CARACTERIZAÇÃO E SENSIBILIDADE DE *Colletotrichum* spp. ISOLADO DE *Vitis labrusca* A ÓLEOS ESSENCIAIS

**RESUMO:** A viticultura é uma atividade de importância econômica e social, sendo a uva a quarta fruta mais produzida no Brasil. Entre os anos de 2016 e 2021, houve reduções nas áreas cultivadas e na produtividade de uvas. As adversidades climáticas, a ocorrência de doenças e a dificuldade no controle destas constituem entraves para a sua produção. Dentre as enfermidades que afetam a cultura, a antracnose e a podridão da uva madura são doenças importantes, pois além de serem destrutivas, afetam várias cultivares de videira. São responsáveis por ocasionar danos na produção, reduzindo significativamente a qualidade e quantidade de frutos. A antracnose é relatada como causada pelo fungo *Elsinoe ampelina* e a podridão da uva madura é associada a *Glomerella cingulata*. No entanto, estudos recentes apontam espécies de *Colletotrichum* como agentes causais das duas doenças. O controle ocorre basicamente por fungicidas e seu uso contínuo e não racional pode promover a seleção de genótipos resistentes do patógeno. Desta forma, novas alternativas são estudadas para o controle de fitopatógenos que agregam aos métodos convencionais, como a utilização de óleos essenciais e seus compostos majoritários. Há indicativos que os mesmos sejam eficientes na prevenção do desenvolvimento de populações resistentes de patógenos e pragas. Este estudo teve como objetivo caracterizar os agentes causais da antracnose da videira coletados nos estados do Mato Grosso do Sul, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Além disso, avaliar a sensibilidade dos mesmos aos óleos essenciais de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* [L] Merr. et Perry), canela (*Cinnamomum cassia* Presl) e eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill) e seus compostos majoritários, eugenol, cinamaldeído e eucaliptol, respectivamente. Foi realizada a caracterização cultural e morfológica dos isolados de *Colletotrichum* spp., teste de patogenicidade em folhas e frutos e avaliação da atividade antifúngica dos óleos e compostos citados sobre os isolados, *in vitro*. De acordo com as características culturais encontradas nos isolados de diferentes origens geográficas, os padrões de caracterização cultural e morfológica sugerem que os mesmos podem pertencer aos complexos de *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* e *Elsinoe ampelina*. As substâncias testadas foram eficazes no controle de *Colletotrichum* spp. e os resultados indicam que as mesmas exerceram efeitos fungistáticos e fungicidas. Cada óleo essencial e seu composto apresentou um comportamento diferente frente aos isolados e isso pode estar relacionado à sua composição. Os resultados sugerem que os mesmos podem ser explorados como tratamento alternativo e no desenvolvimento de novos produtos para o controle da antracnose e da podridão da uva madura no campo.

**PALAVRAS-CHAVE:** óleos voláteis, *Colletotrichum* spp., *Elsinoe ampelina*, eugenol, eucaliptol, cinamaldeído.

## CHARACTERIZATION AND SENSITIVITY OF *Colletotrichum* spp. from *Vitis labrusca* ISOLATED TO ESSENTIAL OILS

**ABSTRACT:** Viticulture is an activity of economic and social importance, with grapes being the fourth most produced fruit in Brazil. Between 2016 and 2021, there were reductions in cultivated areas and grape productivity. Climatic adversities, the occurrence of diseases and the difficulty in controlling these constitute obstacles to its production. Among the diseases that affect the crop, anthracnose and ripe grape rot are important diseases, because in addition to being destructive, they affect several vine cultivars. They are responsible for causing damage to production, significantly reducing the quality and quantity of fruits. Anthracnose is reported to be caused by the fungus *Elsinoe ampelina*, and ripe grape rot is associated with *Glomerella cingulata*. However, recent studies point to *Colletotrichum* species as causal agents of both diseases. Control occurs basically by fungicides, and their continuous and non-rational use can promote the selection of resistant genotypes of the pathogen. In this way, new alternatives are studied to control phytopathogens that add to conventional methods, such as the use of essential oils and their major compounds. There are indications that they are efficient in preventing the development of resistant populations of pathogens and pests. This study aimed to characterize the causal agents of grapevine anthracnose collected in Mato Grosso do Sul, Paraná, Santa Catarina, and the Rio Grande do Sul. In addition, to evaluate their sensitivity to clove (*Syzygium aromaticum* [L] Merr. et Perry), cinnamon (*Cinnamomum cassia* Presl), and eucalyptus (*Eucalyptus globulus* Labill) essential oils and their major compounds, eugenol, cinnamaldehyde, and eucalyptol, respectively. Cultural and morphological characterization of *Colletotrichum* spp. isolates, pathogenicity test on leaves and fruits, and evaluation of the antifungal activity of the oils and compounds mentioned on the isolates were carried out *in vitro*. According to the cultural characteristics found in the isolates from different geographic origins, the cultural and morphological characterization patterns suggest that they may belong to the complexes of *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* and *Elsinoe ampelina*. The substances tested effectively controlled *Colletotrichum* spp., and the results indicate that they exerted fungistatic and fungicidal effects. Each essential oil and its compound showed a different behavior than the isolates, which may be related to its composition. The results suggest that they can be explored as an alternative treatment and in developing new products to control anthracnose and ripe grape rot in the field.

**KEYWORDS:** volatile oils, *Colletotrichum* spp., *Elsinoe ampelina*, eugenol, eucalyptol, cinnamaldehyde.

## 1 INTRODUÇÃO

A viticultura é uma atividade de importância econômica e social, sendo a uva a quarta fruta mais produzida no Brasil, com aplicações na indústria de alimentos e vinhos. Atualmente a área plantada com videiras é de aproximadamente 75 mil hectares, com vinhedos estabelecidos desde o extremo sul do país até regiões situadas muito próximas a linha do equador (EMBRAPA, 2021).

A produção de uvas no Brasil, em 2020, foi de aproximadamente 1.400 toneladas, 2,03% inferior à produzida em 2019 (MELLO e MACHADO, 2021). A dificuldade no controle de doenças e pragas, os problemas climáticos enfrentados pelos vitivinicultores e a falta de assistência técnica, constituem entraves para a produção qualitativa e quantitativa de uva (GARRIDO et al., 2005; KOWAL et al., 2022).

Dentre as enfermidades que afetam a cultura, a antracnose e a podridão da uva madura são doenças importantes, pois além de serem destrutivas, afetam várias cultivares de videira. São responsáveis por ocasionar danos severos na produção, reduzindo significativamente a qualidade e quantidade de frutos (BRAGA et al., 2019).

A antracnose é relatada como causada pelo fungo *Elsinoe ampelina* e a podridão da uva madura é associada a *Glomerella cingulata*. Entretanto, técnicas de classificação morfológica e molecular permitiram a identificação de espécies de *Colletotrichum* como agentes etiológicos tanto da antracnose quanto da podridão da uva madura (SANTOS et al., 2018; ECHEVERRIGARAY et al., 2020).

*Colletotrichum* é um gênero que reúne mais de 200 espécies. Afeta plantas cultivadas causando lesões em diferentes órgãos, com sintomas em folhas, caules e frutos. A videira é suscetível à infecção por *Colletotrichum* no seu ciclo vegetativo, desde a floração até o início do amadurecimento (CANNON et al., 2012; ECHEVERRIGARAY et al., 2020).

O controle de ambas as doenças inclui o uso de fungicidas e seu uso contínuo tem causado problemas como a seleção de fungos patogênicos resistentes (FURUYA et al., 2010). Além disso, tem sido um desafio para a fruticultura a produção de alimentos de qualidade, para atender os requisitos de sustentabilidade ambiental, segurança alimentar e viabilidade econômica, utilizando tecnologias mais seguras ao meio ambiente e à saúde humana (ANDRIGUETO et al., 2002). Assim, os produtos de origem vegetal e seus

análogos, são importantes fontes de novos defensivos agrícolas para serem utilizados no controle de doenças.

Os óleos essenciais, caracterizados como metabólitos secundários de plantas, são de baixa toxicidade aos mamíferos e vêm sendo testados no controle de fitopatógenos (AMADIOHA, 2000). Estudos têm comprovado o efeito dos compostos majoritários extraídos de óleos essenciais e que atuam como fungicidas naturais inibindo a atividade fúngica (MAIA et al., 2015).

Considerando o exposto, este estudo teve como objetivo caracterizar os agentes causais da antracnose da videira coletados nos estados do Mato Grosso do Sul, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Além disso, avaliar a sensibilidade dos mesmos aos óleos essenciais de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* [L] Merr. et Perry), canela (*Cinnamomum cassia* Presl) e eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill) e seus compostos majoritários eugenol, cinamaldeído e eucaliptol.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Panorama da viticultura brasileira

A viticultura brasileira apresenta características regionais distintas e importância econômica e social pela geração de empregos e rendas, principalmente onde predominam as pequenas propriedades de agricultura familiar. Além disso, existe também o desenvolvimento territorial associado as atividades ligadas ao turismo (ZANUS, 2015; FERRANTI, 2017).

A produção de uvas no Brasil, em 2020, foi de aproximadamente 1.400 toneladas, concentrando a maior produção na região Sul, que representa 61% da produção nacional. A região Nordeste é segunda maior produtora da fruta, contribuindo com 27% da produção, seguida da região Sudeste, cuja produção de uvas representou 12% (MELLO e MACHADO, 2020).

Cada região produtora apresenta particularidades em relação ao ciclo de produção, época de poda, época de colheita, cultivares, tratamentos culturais, tipo de produto e foco de mercado. Basicamente a produção é dividida em dois grupos, uva para consumo *in natura* e uva para o processamento (MELLO e MACHADO, 2019). O segmento de uvas de mesa (finas e rústicas) representa mais da metade da área cultivada, e as uvas para processamento, são destinadas à elaboração de vinhos finos, vinhos de mesa, espumantes, suco de uva, além de destilados e vinagres (ZANUS, 2015).

Importantes avanços ocorreram no setor, como a adoção de cultivares adaptadas a diferentes regiões, uso de práticas e processos mais sustentáveis e implementação de novas tecnologias, possibilitando a ampliação da fronteira vitícola (CAMARGO et al., 2011; NETO, 2021).

Atualmente a área plantada com videiras é de aproximadamente 75 mil hectares, com vinhedos estabelecidos desde o extremo sul do país até regiões situadas muito próximas a Linha do Equador (EMBRAPA, 2021). De acordo com Mello e Machado (2021), a maior área cultivada está concentrada na região Sul, com 54.716 ha, representando 73,12% da área vitícola. Nessa região, o Rio Grande do Sul é o principal estado produtor, seguido do Paraná e Santa Catarina. A região Sudeste apresenta área ocupada por videiras de 9.464 ha, constituindo 12,65% da área vitícola do país, essa região engloba o estado de São Paulo, Minas Gerais, Espírito Santo e Rio de Janeiro. A região Nordeste, possui 10.268 ha de vinhedos e representa 13,94% da área vitícola

nacional, essa região concentra sua viticultura no Vale do São Francisco (Pernambuco e Bahia). A região centro-oeste, compreendida pelos estados do Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás e Distrito Federal, possui 190 ha de área cultivada, correspondendo a 0,3% da produção nacional de uvas.

Em função da diversidade ambiental, existem diferentes polos de viticultura no país, que podem ser divididos em três categorias: clima temperado, subtropical e tropical. A viticultura de clima temperado é considerada tradicional, concentrada nos estados do Sul e do Sudeste do Brasil e a maior parte da uva produzida é utilizada para processamento de vinhos, sucos e outros derivados (PROTAS et al., 2006). Nessas regiões, os invernos apresentam temperaturas baixas e por períodos prolongados, em decorrência disso, somente uma colheita é possível no ano. No verão, as temperaturas são amenas e as chuvas ao longo do ano são regularmente distribuídas. Nesta região as podas são realizadas ainda no inverno, entre o fim de julho e início de agosto, e a brotação inicia-se no final do inverno e início da primavera, quando as temperaturas sobem. A colheita vai do início de janeiro até final de abril com cultivares mais tardias. As variedades mais utilizadas são a Niágara Rosada, Niágara Branca e Isabel (MAIA et al., 2018).

A viticultura subtropical se desenvolveu no Norte do estado do Paraná e no leste de São Paulo, predominando o cultivo de uvas finas para consumo *in natura* (PROTAS et al., 2006). Os invernos são amenos e curtos, porém, sujeitos à ocorrência de geadas. Nessas condições, a videira tem um período de dormência natural nos meses de junho e julho, quando manejada da maneira tradicional, apresenta apenas um ciclo por ano. Porém, dependendo do manejo adotado, podem ser realizados dois ciclos vegetativos, com a obtenção de duas colheitas por ano (CAMARGO et al., 2011).

As regiões do Vale do São Francisco, Noroeste Paulista e Norte de Minas Gerais correspondem à viticultura tropical. Esta categoria é típica de regiões onde o inverno não é severo, e, portanto, a dormência das videiras não ocorre naturalmente, elas passam somente por repouso vegetativo. Assim, após a poda, é necessária a aplicação de indutores para estimular e padronizar a brotação. Com o uso de tecnologia apropriada é possível à obtenção de duas ou mais colheitas por ano no mesmo vinhedo. Dentre as cultivares utilizadas a predominante é a Niágara Rosada, uma variedade rústica com melhor adaptação as condições edafoclimáticas da região (CAMARGO et al., 2011; SILVA et al., 2019).

Entre as espécies de videiras exploradas, as mais importantes para a viticultura brasileira são as espécies *Vitis labrusca* L., originária da América do Norte, e a *Vitis*

*vinifera* L., originária da Ásia-Europa. As cultivares de *V. labrusca*, ou híbridas, de maior destaque para o Brasil, são a Isabel, a Niágara Branca, a Niágara Rosada, a Concord e a Ives. Da espécie *V. vinifera*, destacam-se as cultivares Cabernet Sauvignon, Merlot, Chardonnay, Itália e suas mutações (Rubi, Benitaka e Brasil) (MANDELLI et al., 2009). Além dessas, as cultivares apirênicas também são importantes, como a BRS Clara, BRS Linda, BRS Vitória, BRS Isis, BRS Melodia e BRS Tainá (EMBRAPA, 2022).

Com as tecnologias voltadas para o campo, a vitivinicultura vem experimentando mudanças nas técnicas de produção em várias regiões, despertando interesse por pesquisas no setor, principalmente quando a atividade é realizada em territórios produtores, que apresentam grande capacidade de produção de uva e vinhos de alta qualidade e com perspectivas de crescimento (HORA et al., 2016). Para Almeida et al. (2017), o setor beneficia-se da evolução da biotecnologia e da genética mediante a introdução de novas cultivares. Além de mudanças no processo de produção, com inovações nas técnicas de cultivo, como a reconversão dos vinhedos, implantação do cultivo protegido e adoção da cultura orgânica.

Apesar de todos esses avanços no setor, a área plantada e a produção de uvas no Brasil vêm diminuindo com o passar dos anos. Entre 2017 a 2020, a redução na área com videiras foi de 4% e a produção de uvas teve queda de aproximadamente 16% (MELLO e MACHADO, 2021).

Em grande parte de suas regiões, o Brasil possui características climáticas favoráveis ao aparecimento de doenças nos vinhedos, que afetam tanto a produção quanto a qualidade dos frutos produzidos. Durante todo o ciclo da cultura, a videira está sujeita a uma série de doenças, principalmente as causadas por fungos, que podem ocorrer em todas as partes da planta, como raízes, troncos, ramos, folhas, brotos e cachos (NAVES et al., 2005; NOGUEIRA JÚNIOR et al. 2021).

Os fungos do gênero *Colletotrichum* são fitopatógenos importantes, causadores de uma diversidade de doenças, dentre elas a antracnose e a podridão da uva madura em videiras (BAILEY e JEGER, 1992). São enfermidades destrutivas e afetam várias cultivares de uvas, responsáveis por ocasionar danos severos na produção, reduzindo significativamente a qualidade e quantidade de frutos produzidos (BRAGA et al., 2019).

## 2.2 *Colletotrichum* spp. em videira

### 2.2.1 Antracnose da videira

A antracnose da videira é uma doença de origem europeia, conhecida também como varíola, olho de passarinho, negrão ou carvão, e está presente nas regiões produtoras de videira no Brasil (SÔNEGO et al., 2003). É relatada como sendo causada por *Elsinoe ampelina* (de Bary) (anamorfo *Sphaceloma ampelinum*) (SHEAR, 1929). No entanto, estudos recentes relatam como agentes causais da doença algumas espécies de *Colletotrichum* (*Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum acutatum*, *Colletotrichum capsici*) (CHOWDAPPA et al. 2009; SAWANT et al. 2012; GARRIDO e GAVA, 2014; PIVA, 2017; LI et al. 2019). Para Pirrello et al. (2019), independentemente do agente causal os sintomas relatados para a doença são semelhantes.

Esta doença é importante principalmente em regiões de clima úmido, podendo causar sérios danos não só à produção do ano, como também às produções futuras. As condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento da doença são ventos frios e umidade relativa elevada. Temperaturas de 2°C a 32°C permitem que o patógeno cause infecção, embora a faixa de temperatura ótima para o seu desenvolvimento seja de 24°C a 26°C. A temperatura e a umidade são fatores ambientais que mais influenciam no desenvolvimento da doença (NAVES et al., 2006).

A antracnose é responsável por ocasionar danos severos na produção, reduzindo significativamente a qualidade e a quantidade de frutos. A doença surge desde a abertura do botão até o final do ciclo da cultura, o fungo pode afetar toda a parte aérea da planta, sendo mais prejudicial aos tecidos jovens (BARROS et al., 2015). Os sintomas podem aparecer em folhas, caules, pecíolos, raquis, gavinhas e bagas. As lesões são numerosas, circulares e longitudinais, variam de 1 a 5 mm e apresentam coloração marrom-escuro a cinza-escuro, com margens pretas e bem definidas (AGRIOS, 2005; THIND, 2015).

*Sphaceloma ampelinum* produz acérvulos no exterior das lesões, com conídios unicelulares, hialinos e ovoides (3-6 x 2-8 µm), formados sobre conidióforos curtos e cilíndricos. Durante o crescimento vegetativo da videira, os conídios ou ascósporos em peritécios, formados na fase sexuada do patógeno, são disseminados pela chuva e o vento, quando atingem o tecido jovem do hospedeiro, germinam e iniciam a infecção primária (forma perfeita ainda não foi constatada no Brasil) (Figura 1). Nas lesões primárias resultantes, produz-se o inóculo secundário, responsável por lesões em outras partes da

videira, como gavinhas, pecíolos, folhas, pedúnculos e bagas. O patógeno requer pelo menos 12 horas de molhamento do tecido vegetal e os sintomas aparecem 7 dias após a infecção. Quando a produção de acérvulos cessa, escleródios são formados nas extremidades das lesões, sendo as principais estruturas de sobrevivência do fungo durante o inverno em clima temperado. O patógeno também pode sobreviver em restos culturais e em lesões na planta. A propagação da doença a grandes distâncias se dá pela utilização de material de propagação infectado (SÔNEGO et al., 2003; GARRIDO e GAVA, 2014).



FIGURA 1. Ciclo da antracnose da videira. Fonte: SÔNEGO et al., 2003.

### 2.2.2 Podridão da uva madura

A podridão da uva madura ou podridão de *Glomerella* é uma das principais podridões de cachos e se tornou um sério problema para a viticultura no Sul do Brasil, principalmente em anos com alta umidade e altas temperaturas. É uma doença importante a partir do estágio de maturação e provoca perdas tanto na qualidade (cor e sabor) como na quantidade de uvas produzidas (GARRIDO e SÔNEGO, 2004; CARVALHO et al. 2011).

A doença é causada pelo fungo *Glomerella cingulata* (Penz.) (anamorfos *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum acutatum*) (GARRIDO e GAVA, 2014), porém, segundo Echeverrigaray et al. (2019), outras espécies desse gênero têm sido associadas à doença em várias regiões vitivinícolas do mundo, como *Colletotrichum*

*fruticola*, *Colletotrichum viniferum* e *Colletotrichum capsici*. A prevalência dessas espécies varia de acordo com a região.

Essa doença pode afetar as folhas e caules da videira, porém, os sintomas típicos geralmente aparecem nas bagas maduras. No final da floração ou em bagas jovens, o fungo penetra na epiderme e fica latente até os estádios mais adiantados da maturação, quando os primeiros sintomas começam a aparecer. Inicialmente são manchas circulares marrom-avermelhadas que aumentam em lesões concêntricas atingindo todo o fruto. Em condições ideais, pode ocorrer o desenvolvimento de acérvulos (corpos frutíferos assexuados), os quais aparecem em forma de pontuações escuras e concêntricas, com exsudações laranja a rosa, que correspondem a massa de conídios do fungo. As bagas escurecem, perdem o turgor e murcham, podendo permanecer na raqui ou cair no solo. Durante o inverno, o patógeno da podridão da uva madura sobrevive principalmente em frutos mumificados, pedicelos infectados e micélio dormente, que são fontes de inóculo primário. Na primavera ascósporos ou conídios produzidos pelo micélio sobrevivente causam a infecção primária. A fase perfeita ou sexual é importante na sobrevivência do patógeno, porém, no ciclo da doença não é relevante. No entanto, é responsável pela infecção primária e pelos processos que levam à variabilidade genética do patógeno (Figura 2) (MILHOLLAND, 1988; GARRIDO e SÔNEGO, 2004; CAVALCANTI e GARRIDO, 2015).

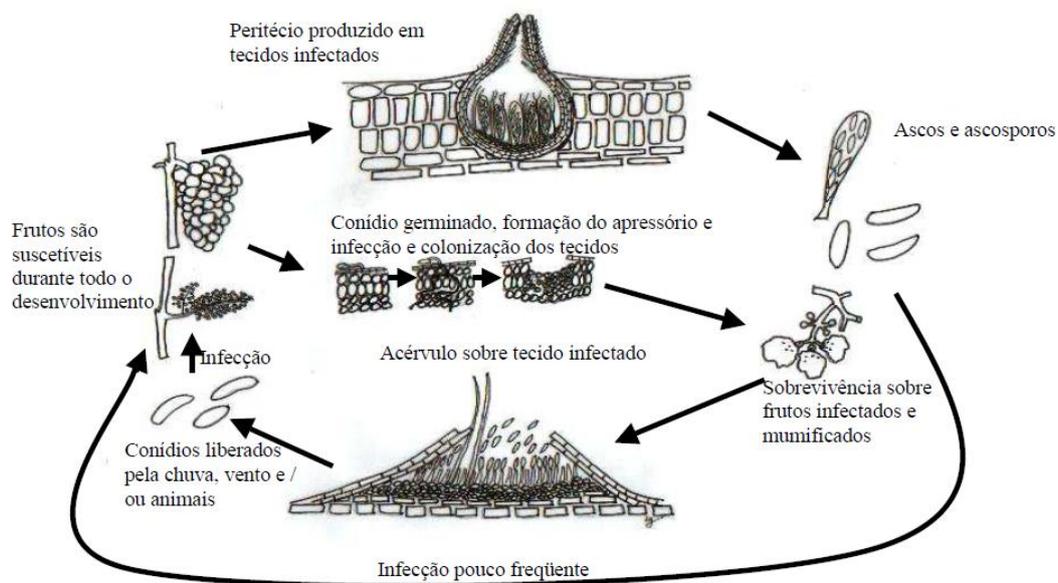


FIGURA 2. Ciclo de vida do fungo *Glomerella cingulata* na uva. Fonte: GARRIDO e SÔNEGO, 2004.

Os conídios são hialinos, variando no formato e no tamanho (12-21 x 3,5-6 µm). Esses esporos são produzidos em condições favoráveis, entre 20 e 30°C, envoltos em uma massa mucilaginosa hidrossolúvel. Em condições de alta umidade, a mucilagem que os envolve é desfeita possibilitando a disseminação do patógeno. Quando os conídios germinam, produzem o apressório e penetram a cutícula dos frutos. Em frutos verdes, o fungo cessa o crescimento após a penetração, causando uma infecção latente, até o amadurecimento. A esporulação em frutos maduros, próximo à colheita, produz inóculos secundários (GARRIDO e GAVA, 2014).

### 2.2.3 Controle

O controle da antracnose da videira e da podridão da uva madura ocorre basicamente pelo uso de fungicidas. Para a antracnose, a aplicação deve ser feita no início da brotação de ramos novos, ocorrendo semanalmente até o início da maturação. O número de pulverizações necessárias varia entre 12 a 16 por ciclo produtivo. Quando a doença já atingiu a produção em anos anteriores, deve-se iniciar o controle no período de repouso da cultura, através de poda e queima de ramos dormentes ou tratamento químico de inverno, ambos visando a eliminação ou diminuição do inóculo já instalado (JUNIOR, 2009).

Para o controle da podridão da uva madura, deve-se realizar pulverizações com fungicidas em alguns estádios de desenvolvimento da planta, sendo eles: após a floração, na fase de grão chumbinho, no início da compactação do cacho, no início da maturação e durante a maturação da uva, respeitando sempre o período de carência do fungicida utilizado. A remoção e queima de cachos mumificados e das partes que foram podadas no inverno, são medidas que reduzem fontes de inóculo, auxiliando no controle da doença (GARRIDO e SÔNEGO, 2004; SÔNEGO et al., 2005).

Os grupos químicos de fungicidas registrados para o controle de ambas as doenças, no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), são os ditiocarbamatos, estrobilurinas, isoftalonitrilas, triazóis, benzimidazóis e os inorgânicos. Para a antracnose da videira, além desses, também são utilizadas as dicarboxamidas e as quinonas. Um total de 67 produtos formulados estão inseridos no Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (AGROFIT) para o controle da antracnose da videira e 40 produtos estão registrados para o controle da podridão da uva madura (MAPA; AGROFIT, 2022).

No controle podem ser empregados fungicidas multissítios, que interferem em muitos processos metabólicos do fungo, como os baseados em cobre (hidróxido e

oxicloreto de cobre) e nos grupos químicos isoftalonitrila, ditiocarbamato, ftalimida e quinona. Uma vez absorvidos pela célula fúngica, agem sobre processos como a atividade enzimática, desorganizando numerosas rotas metabólicas. Também podem ser utilizados fungicidas de sítio-específico, os quais são ativos contra um único ponto da via metabólica do patógeno ou contra uma única enzima ou proteína necessária para o fungo. Por exemplo, o grupo químico dos tiofanatos, que atuam na interferência da mitose celular, os triazóis, inibem a síntese do ergosterol e os do grupo metoxi-acrilato (estrobilurinas), interferem na respiração celular (GODOY et al., 2018; FRAC, 2020).

O uso indiscriminado dos produtos químicos tem elevado à resistência dos fungos fitopatogênicos e a contaminação do meio ambiente (OOTANI et al., 2013). Até o momento, mais de 50 modos de ação foram identificados para fungicidas, e aqueles que têm modo de ação em sítio-específico são mais problemáticos, uma vez que a resistência pode evoluir rapidamente por uma única mutação. Os patógenos apresentam resistência cruzada a compostos com o mesmo modo de ação (FRAC, 2020).

Para Garrido e Botton (2021), o controle adequado e racional das doenças da videira inicia-se com a identificação do problema, as condições favoráveis ao patógeno, os métodos de controle disponíveis e a utilização correta dos agrotóxicos. O manejo da resistência é importante na cultura, principalmente quando não se dispõe de grande número de classes químicas de produtos para o controle do organismo-alvo. A finalidade é prevenir ou postergar ao máximo o acúmulo de indivíduos resistentes em uma população de patógenos, preservando a efetividade dos produtos disponíveis.

Devido a esse e outros potenciais impactos negativos da aplicação excessiva de fungicidas, há necessidade de desenvolver novos produtos para o controle de doenças. Portanto, têm-se aumentado o interesse em desenvolver e resgatar a utilização das substâncias naturais contra os patógenos. Além disso, com o avanço do sistema orgânico de produção, a busca pela redução dos impactos ambientais e a segurança alimentar, houve a necessidade de pesquisar novas moléculas bioativas naturais para o controle de doenças (DE MORAIS, 2009; DE CARVALHO et al. 2015).

Algumas plantas produzem compostos secundários que podem ser utilizados para o desenvolvimento de defensivos naturais ou serem precursores de semi-síntese química, na fabricação de novos produtos fitossanitários (DE MORAIS, 2009). Entre os extratos vegetais que favorecem o desenvolvimento de estratégias de manejo eficientes contra os patógenos culturais, os óleos essenciais e seus componentes têm sido investigados entre os agentes antimicrobianos (VELOZ et al., 2020). O crescente interesse das indústrias por

produtos naturais impulsiona os pesquisadores na busca pelo isolamento, caracterização e estudo das propriedades das substâncias bioativas presentes nos óleos, que têm sido comumente utilizados e reconhecidos mediante sua ação antimicrobiana. Além disso, a diversidade da flora brasileira apresenta um imenso potencial para a produção de compostos secundários que podem ser utilizados no controle das doenças fúngicas (SIMÕES et al., 2016).

### 2.3 Óleos essenciais

Os óleos essenciais, também chamados de óleos voláteis ou óleos etéreos, são misturas complexas de substâncias voláteis, com baixo peso molecular, lipofílicas e geralmente odoríferas (odor agradável e marcante). Em temperatura ambiente apresentam aspecto oleoso, geralmente são incolores ou levemente amarelados, possuem sabor ácido e picante e são instáveis na presença de luz, calor, ar e umidade. São solúveis em álcool, éter e outros compostos graxos, porém, insolúveis em água (MAIA et al., 2015; MORAIS, 2009; ANDREI et al., 2005).

A produção dos óleos essenciais ocorre em estruturas secretoras especializadas, como os tricomas glandulares, cavidades secretoras, células parenquimáticas diferenciadas, canais oleíferos ou em bolsas específicas. Estas estruturas podem estar localizadas em algumas partes específicas ou por todos os órgãos das plantas, como flores, folhas, caules, sementes, frutos, raízes, madeira, cascas das árvores e dos frutos (VITTI e BRITO, 2003). O método de extração pode ser por fermentação e enfleurage, porém, o método de destilação a vapor é o mais utilizado para a produção comercial de óleos voláteis (BURT, 2004).

Os óleos essenciais são produtos do metabolismo secundário que desempenham um papel importante na defesa das plantas. Chamamos de metabolismo o conjunto de reações químicas que ocorrem continuamente nas células, direcionadas pela ação das enzimas. Os metabolismos primário e secundário são responsáveis pela produção de moléculas imprescindíveis para a sobrevivência das plantas (DE MORAIS, 2009).

Os compostos sintetizados no metabolismo primário são macromoléculas, que estão relacionadas com a manutenção e sobrevivência dos organismos, como a celulose, lignina, proteínas, lipídeos, açúcares, entre outras. Já as substâncias resultantes do metabolismo secundário, aparentemente não possuem relação com crescimento e desenvolvimento da planta (TAIZ e ZEIGER, 2006). Os compostos secundários são substâncias que conferem vantagens à sobrevivência do vegetal e estão envolvidos na

adaptação das plantas no ambiente. Desempenham papéis ecológicos, como a proteção contra herbívoros e ataque de patógenos, competição entre plantas e atração de organismos benéficos, como polinizadores, dispersores de sementes e microrganismos simbiotes (RIFFEL e COSTA, 2015).

A composição química e o rendimento dos óleos essenciais são influenciados pelo clima, estação do ano (luminosidade, temperatura, pluviosidade), condições geográficas (radiação, composição atmosférica), época e período de colheita (hora e dia), idade e estágio de desenvolvimento da planta, estado nutricional, órgão extraído, técnica de extração, preparação da matéria prima (secagem), entre outros fatores (MAIA et al., 2015). Para obter óleos essenciais com composição constante, estes devem ser extraídos nas mesmas condições, além de serem provenientes do mesmo órgão da planta, mesmo solo, clima e colhido na mesma estação (BAKKALI et al., 2008).

Os óleos essenciais são uma mistura complexa de dezenas de compostos com diferentes comportamentos, grupos funcionais e polaridade (MIRANDA et al., 2016). A constituição química é muito variada, podendo conter de 20 a 60 componentes em concentrações diferentes. São caracterizados basicamente por dois ou três constituintes principais, chamados compostos majoritários, que se encontram em maiores proporções (20-70%) em comparação com outros componentes. Cerca de 30 a 40 compostos são minoritários com concentração inferior a 1%. Geralmente, os componentes principais determinam as propriedades biológicas dos óleos essenciais (BAKKALI et al., 2008). A análise composicional detalhada pode ser obtida através da cromatografia gasosa e espectrometria de massa (BURT, 2004).

Os componentes químicos presentes nos óleos voláteis podem ser divididos em duas classes com base na biossíntese. Na primeira se encontram os derivados dos terpenos, sintetizados no citoplasma das células vegetais, formados pela via do ácido mevalônico-acetato, responsável pela formação dos monoterpenos e sesquiterpenos. Também existem cadeias mais longas, como diterpenos e triterpenos. Alguns exemplos de terpenos incluem p-cimeno, limoneno, terpineno, sabineno e pineno (CABALLERO et al., 2003; HYLDGAARD et al., 2012). Segundo De Morais (2009), os monoterpenos e os sesquiterpenos são compostos encontrados com maior frequência na natureza, sendo os responsáveis por grande parte das atividades biológicas dos óleos essenciais. Quando um terpeno contém oxigênio, o mesmo é denominado de terpenoide, podendo apresentar diferentes funções químicas, entre as quais: ácidos, álcoois, aldeídos, cetonas, éteres, fenóis ou epóxidos terpênicos. Alguns exemplos de terpenoides: 1,8-cineol (eucaliptol),

linalol, cânfora, acetato de geranila, acetato de nerila, geraniol, nerol, terpinen-4-ol e cinamaldeído (RAO et al., 2019). De acordo com Lorena e Bicas (2017), de forma geral, os óleos essenciais são constituídos majoritariamente por terpenos ou seus derivados.

Na segunda classe de biossíntese, se situam os derivados do fenilpropanoide, compostos aromáticos formados pela via do ácido chiquímico (KNAAK e FIUZA, 2010). Constituem uma parte relativamente pequena dos óleos essenciais, e os mais estudados são timol, eugenol e carvacrol (HYLDGAARD et al., 2012).

A caracterização dos óleos essenciais dá uma visão geral de seu espectro de atividade biológica devido à presença de diferentes compostos químicos bioativos, que podem ter atividades biológicas variadas, como antibacteriana, antifúngica, larvicida e inseticida (BASAK e GUHA, 2018). No geral, os constituintes dos óleos essenciais que exibem alta eficácia antimicrobiana são os fenóis e os terpenóides (CHOUHAN et al., 2017; RAO et al., 2019; VELOZ et al., 2020).

A diversidade de substâncias ativas presentes nas plantas tem motivado o desenvolvimento de pesquisas envolvendo óleos essenciais, tendo em vista o controle de doenças. Existem relatos da atividade direta sobre fitopatógenos e/ou indireta, com a ativação de mecanismos de defesa das plantas (OOTANI et al., 2013). De acordo com Daferera et al. (2000), a atividade antimicrobiana do óleo essencial pode ser devido ao efeito isolado dos componentes principais ou devido a um efeito sinérgico de seus componentes secundários.

### 2.3.1 Óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* [L] Merr. et Perry). e composto eugenol

O cravo-da-índia é uma árvore com copa alongada, que varia de 10 a 15 m de altura, possui folhas ovais grandes, verde-brilhantes e onduladas. Suas flores são pequenas, fortemente aromáticas, de cor verde-amarelada a vermelha que se apresentam em numerosos grupos de cachos terminais. Pertence à família Myrtaceae (rica em óleos essenciais), nativa das ilhas Maluku no leste da Indonésia e aclimatada na África e no Brasil (ALMA et al., 2007; DA GRAÇA CARDOSO et al., 2007). É conhecida cientificamente pelo nome de *Syzygium aromaticum* [L] Merr. et Perry, porém, apresenta alguns sinônimos taxonômicos: *Eugenia caryophyllus* (Sprengel) Büllock et Harrison, *Caryophyllus aromaticus* L, *Eugenia caryophyllata* Tumb e *Eugenia aromatica* (L) Baill (MAEDA et al., 1990).

A espécie é explorada principalmente para extração industrial do óleo essencial, que é obtido a partir dos botões florais, folhas e outras partes da planta (LORENZI e MATOS, 2002). Pode ser extraído a partir de processos relativamente simples, sendo a destilação por arraste a vapor a mais utilizada, por gerar um óleo essencial de excelente qualidade e permitir o processamento de grandes quantidades de matéria prima (SILVEIRA et al. 2012). No Brasil, o cultivo do cravo ocorre principalmente no estado da Bahia, o qual apresenta uma produção estimada de 2.500 toneladas por ano (CORTÉS-ROJAS et al., 2014)

O óleo essencial de cravo é amplamente utilizado e conhecido por suas propriedades medicinais. Além disso, estudos relatam atividades antifúngicas, antibacterianas, anticarcinogênicas, antioxidantes, inseticida, anestésicas e anti-inflamatórias (RANA et al., 2011; COSTA et al., 2011; AFFONSO et al., 2012). Apresenta como seu principal componente o eugenol (4-alil-2-metoxifenol) e possui em proporções menores o acetato de eugenol ( $\beta$ -cariofileno), além de outros compostos com proporções pouco significativas (AFFONSO et al., 2012).

O eugenol ( $C_{10}H_{12}O_2$ ) é um composto de ocorrência natural e está presente em várias famílias de plantas, porém, sua principal fonte natural é o *S. aromaticum*, (45 a 90%) (KAMATOU et al., 2012). Trata-se de um líquido incolor ou amarelado com odor característico de cravo e um sabor picante. Apresenta peso molecular de 164,20 g/mol e densidade de 1,0664 g/L. É classificado como um fenilpropanóide, com um guaiacol substituído por cadeia alila, considerado um ácido fraco pouco solúvel em água e solúvel em álcool etílico, éter, clorofórmio e óleo (OLIVEIRA et al., 2009; NEJAD et al., 2017).

De acordo com Kamatou et al. (2012), o eugenol é uma molécula versátil com aplicações na indústria farmacêutica, agrícola, de fragrâncias, aromatizantes, cosméticos, entre outras. Possui atividades antimicrobianas, anti-inflamatórias, analgésicas, antioxidantes, anticancerígenas e antifúngicas. Amplamente utilizado em aplicações agrícolas para proteção de grãos contra microrganismos durante o período de armazenamento (*Penicillium*, *Fusarium* e *Aspergillus* e *Alternaria alternata*) e também como pesticida e fumigante. Segundo Nisar et al. (2021) o eugenol tem efeitos letais no crescimento de diferentes linhagens de fungos como *Fusarium graminearum*, *F. moniliforme*, *Tricophyton rubrum*, *Penicillium citrinum*, *Candida tropicalis*, *C. krusei* e *Aspergillus ochraceus*.

Pode ser obtido por diferentes técnicas como, por exemplo, destilação a vapor, extração solvente, hidrodestilação, extração assistida por microondas, extração de dióxido de carbono supercrítico e extração à base de ultrassom (KHALIL et al., 2017).

Nos últimos anos, o eugenol tem atraído a atenção de muitos pesquisadores devido suas inúmeras atividades farmacológicas e biológicas, além disso, apresenta benefícios para o setor industrial e a sociedade, uma vez que pertence ao grupo de compostos monoaromáticos livres, enquadrando-se no âmbito de recursos renováveis. Como resultado, estudos com produtos de eugenol e óleo de cravo estão sendo realizados para destacar sua importância na fitoterapia e na indústria, bem como elucidar seus mecanismos de ação sempre que possível. O interesse da comunidade científica pelo eugenol é justificado pelo fato do mesmo ser utilizado como material de partida na síntese de diversos produtos naturais e bioativos (KAMATOU et al., 2012; DA CUNHA LIMA et al, 2019).

### 2.3.2 Óleo essencial de canela (*Cinnamomum cassia*) e composto cinamaldeído

A espécie vegetal *Cinnamomum cassia*, conhecida também como *Cinnamomum aromaticum*, popularmente chamada de Canela da China, é uma das especiarias mais antigas do mundo. Proveniente da China, Vietnam e Indonésia, possui grande valor econômico e é considerada um dos recursos naturais mais importantes, amplamente utilizada nas áreas da indústria farmacêutica, de alimentos, cosméticos e de bebidas (LI et al., 2013).

É uma árvore perene, cresce de 10 a 15 m de altura e possui folhas ovais de coloração verde-escuro. As flores são dispostas em panículas, de cor esverdeada e de odor característico. O fruto da canela é uma baga de cor roxa com uma única semente. O seu sabor deve-se à presença de óleos essenciais aromáticos (JAKHETIA et al., 2010).

*Cinnamomum* é um gênero da família Lauraceae reconhecido mundialmente pelos seus inúmeros benefícios, incluindo sua utilidade na culinária e fitoterapia. Espécies desse gênero são produtoras de óleos essenciais, que apresentaram propriedades biológicas importantes, como ação anti-inflamatória, antimicrobiana, antioxidante e inseticida (DA SILVA et al., 2020).

O óleo essencial de canela contém principalmente cinamaldeído, ácido cinâmico, cinamato e alguns compostos resinosos (SHREAZ et al., 2016), porém, estudos apontam que há uma diferença na composição química nos óleos essenciais em relação as partes da planta utilizadas para a extração, a exemplo, o óleo essencial da casca é rico em

cinamaldeído e suas folhas ricas em eugenol, no entanto, esses constituintes majoritários podem variar dependendo da espécie (VANGALAPATI et al., 2012; JOSHI, 2019).

O cinamaldeído (3-fenil-2-propenal), um álcool terpeno cíclico, é o principal componente ativo do óleo essencial da casca da canela (60-75%) e tem demonstrado exercer atividades antifúngicas e antibacterianas (SILVA et al., 2018). É o composto orgânico responsável pelo sabor e odor da canela, caracterizado por um líquido amarelo oleoso (YEH et al. 2013).

De acordo com Xie et al. (2017), estudos indicam que tanto o óleo essencial da casca da canela, quanto o seu principal componente, o cinamaldeído, possuem atividades antifúngicas contra fungos alimentares e de podridões. De acordo com os autores, ambos os produtos exibiram potente atividade fungicida contra *Rhizoctonia solani* e *Fusarium oxysporum*. Segundo Shreaz et al. (2016), o cinamaldeído é um dos constituintes químicos mais ativo dos óleos essenciais de canela, contribuindo assim para suas várias atividades biológicas. Wu et al. (2020) também mencionam que o cinamaldeído tem demonstrado atividades antifúngicas e antibacterianas, evidenciando que tanto os óleos essenciais quanto seus compostos podem ser substâncias alternativas aos fungicidas sintéticos no manejo de doenças de plantas.

### 2.3.3 Óleo essencial de eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill) e composto eucaliptol

*Eucalyptus globulus* é uma das plantas medicinais mais utilizadas no mundo devido ao seu amplo espectro de atividades biológicas, atribuídas principalmente à diversidade dos seus constituintes fitoquímicos. Os seus componentes apresentam potencial bioativo, antioxidante, antimicrobiano, fitorremediador, atividades herbicidas, fungicidas e inseticidas, podendo assim serem precursores para o desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos e agroquímicos, bem como conservantes de alimentos (SHALA e GURURANI, 2021).

Pertence à família das Myrtaceae, é uma árvore de grande porte, podendo atingir até 90 metros de altura, possui tronco liso, folhas perenes, lanceoladas e opostas, cobertas por glândulas oleríferas. A espécie possui flores de até 4 cm de diâmetro, solitárias ou em pequenos grupos, que possuem numerosos estames macios que podem ser brancos, cremes, amarelos, rosas ou vermelhos. Os frutos apresentam-se em forma de cápsula de aproximadamente 3 cm. A casca possui coloração esverdeada, e apresenta fibras e estrias cujo grau varia de acordo com a idade da planta (SHAH et al., 2012).

*Eucalyptus globulus* tem atraído cada vez mais a atenção de pesquisadores e é comumente utilizado na indústria de celulose e na regeneração de áreas devastadas pelo seu rápido crescimento, além disso, suas folhas são utilizadas para extração de óleos essenciais, um dos mais comercializados em todo o mundo (SHALA e GURURANI, 2021).

O óleo essencial de eucalipto pode ser obtido a partir de suas folhas ou cascas, pelos métodos de hidrodestilação ou por arraste de vapor. A sua composição química é uma mistura complexa de substâncias, comumente contém de 20 a 54 componentes em concentrações variadas. São ricos em compostos monoterpênicos, como o eucaliptol (1,8-cineol) seu componente majoritário (KASSAHUN e FELEKE, 2019).

Segundo Duke e Bogenschutz (2004), entre os vários componentes do óleo de eucalipto, o 1,8-cineol é o mais importante e, de fato, um composto característico do gênero *Eucalyptus*, sendo o responsável por suas propriedades pesticidas. Também denominado cineol, ou 1,8-epoxi-p-mentano, é um monoterpeno com características canforáceas, de fragrância fresca e sabor picante (LANA et al., 2006).

Estudos demonstraram as atividades antimicrobianas dos óleos essenciais de eucalipto contra uma ampla gama de microrganismos. Para Batish et al. (2008), os óleos essenciais de eucalipto e seus principais constituintes possuem toxicidade contra bactérias e fungos, tanto patógenos de solo quanto de pós-colheita, com redução no crescimento micelial e inibição na produção e germinação de esporos.

Pedrotti et al. (2019) avaliaram o efeito *in vitro* e *in vivo* dos óleos essenciais de *Eucalyptus staigeriana* e *Eucalyptus globulus* contra *Botrytis cinerea* e *Colletotrichum acutatum*, duas doenças importantes de podridões da videira. Segundo os autores, os dois óleos mostraram atividade antifúngica *in vitro* contra ambos os patógenos, além disso, o controle alternativo não influenciou na fermentação alcoólica e nas características físico-químicas dos vinhos.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Obtenção dos isolados

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Microbiologia Agrícola e Fitopatologia (LAMAF), da Faculdade de Ciências Agrárias (FCA), da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) e no Laboratório de Fitopatologia do Instituto Federal do Paraná (IFPR), Campus Palmas. Tecidos vegetais (folhas, pecíolos e bagas) de videiras da variedade Niágara Rosada, com sintomas ou sinais típicos de antracnose foram coletados em vinhedos dos Estados do Mato Grosso do Sul, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Figura 3). As amostras foram coletadas nas safras de 2018 e 2019 em 12 vinhedos de 8 municípios desses Estados (Figura 4).



FIGURA 3. Sintomas típicos de antracnose da videira. Dourados-MS, UFGD, 2022.

Com auxílio de uma tesoura de poda, o material vegetal foi coletado, acondicionado em saco de polietileno, identificado e armazenado sob refrigeração a 5°C. Para o isolamento, com auxílio de um bisturi, foram retirados fragmentos da região de transição da lesão com o tecido sadio, desinfestados em solução de álcool 70% por 1 minuto, hipoclorito de sódio a 2,5% por 3 minutos, seguido por três lavagens com água

destilada e esterilizada por 1 minuto e secos em papel filtro estéril. Posteriormente, os fragmentos foram transferidos para placas de Petri estéreis, contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA). Após a identificação e vedação com filme policloreto de vinila (PVC), as placas foram levadas à câmara de incubação do tipo BOD (demanda bioquímica de oxigênio) à temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 horas por três dias. A partir das colônias formadas, discos de micélio foram retirados e transferidos para novas placas de Petri contendo meio BDA. Em seguida as placas foram identificadas, vedadas e incubadas em BOD nas mesmas condições citadas anteriormente por sete dias.

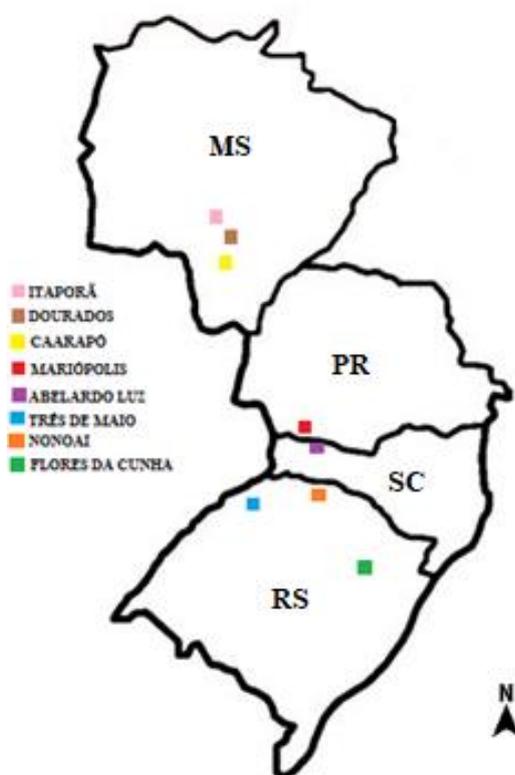


FIGURA 4. Municípios dos estados Rio Grande do Sul (RS), Paraná (PR), Santa Catarina (SC) e Mato Grosso do Sul (MS) onde foram coletadas amostras de tecidos vegetais com sintomas ou sinais típicos de antracnose. Dourados-MS, UFGD, 2022.

### 3.2 Obtenção de culturas monospóricas

Discos miceliais foram retirados das colônias e transferidos para placas de Petri com BDA, em seguida foram vedadas e acondicionadas em câmara BOD regulada a 25°C e fotoperíodo de 12 horas. Decorridos cinco dias, com auxílio de uma espátula de metal,

o micélio das colônias foi raspado e transferido para tubos de ensaio contendo 10 mL de água destilada estéril. Realizou-se uma leve agitação para homogeneização. Com uma pipeta automática, 100 µL da suspensão de estruturas fúngicas foi coletada e distribuída cuidadosamente sobre o meio BDA em placas de Petri. As placas foram incubadas por 14 horas em câmara BOD, nas mesmas condições de temperatura e luminosidade mencionadas anteriormente. Após o período de incubação, a superfície de cada placa foi levada ao microscópio estereoscópio para localizar conídios germinados isoladamente. A remoção foi realizada com auxílio de agulhas ultrafinas em ambiente asséptico. Posteriormente, o material coletado, foi transferido para o centro de novas placas com meio BDA. Cada cultura foi designada com um código referente ao isolado multispórico que lhe deu origem. Para o desenvolvimento das colônias, as placas foram mantidas em câmara BOD a 25 °C, fotoperíodo de 12 horas por dez dias.

### 3.3 Caracterização cultural e morfológica de isolados de *Colletotrichum* spp. como agente causal de doença em videira

Discos de micélio, com 5 mm de diâmetro, das colônias monospóricas, previamente incubadas em meio BDA (cinco dias), foram transferidos para o centro de placas de Petri (80 mm) contendo o mesmo meio de cultivo. As placas foram identificadas, vedadas e incubadas em câmara BOD à temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 horas. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três repetições. Cada repetição correspondeu a uma placa.

As avaliações iniciaram 48 horas após a incubação e foram realizadas diariamente até que um dos isolados atingiu a borda da placa (120 horas). A caracterização foi realizada através da observação das colônias, como a coloração (anverso e verso), densidade do micélio (ralo ou cotonoso), cor da massa de conídios (laranja, salmão, castanho ou preto), padrão de esporulação (concentrado ou distribuído), textura (lisa ou enrugada), margem (regular ou irregular) e presença de setores, peritécios ou halo (ANDRADE et al., 2007; TOZZE JÚNIOR et al., 2015; MARIN-FELIX et al., 2017). Avaliou-se também, o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) e o diâmetro final da colônia (DFC). O diâmetro (média de duas medidas diametralmente opostas) foi mensurado com um paquímetro e para o DFC foi considerado o último valor mensurado na avaliação do crescimento micelial. O IVCM foi determinado utilizando-se a fórmula apresentada por Oliveira (1991):

$$IVCM = \sum (D - D_a) / N$$

Sendo:

D= diâmetro médio atual da colônia;

D<sub>a</sub>= diâmetro médio da colônia do dia anterior;

N= número de dias após a inoculação.

Os esporos utilizados para caracterização morfológica foram obtidos a partir destas colônias, cultivadas por 7 a 20 dias, nas mesmas condições anteriormente citadas, com a finalidade de induzir a produção de conídios. Para mensuração dos mesmos, foram preparadas lâminas semipermanentes. Com auxílio de uma pipeta de Pasteur, uma gota de solução de água destilada com azul de metileno foi depositada na lâmina, em seguida, com uma alça de platina esterilizada foi realizada a coleta da massa de conídios ou a raspagem superficial do micélio da colônia, procedendo-se a homogeneização com a solução. A preparação foi coberta com uma lamínula e examinada ao microscópio óptico com objetiva de 40 X. Avaliou-se a produção ou não de esporos. Sessenta conídios de cada isolado, escolhidos aleatoriamente, tiveram seu comprimento (µm) e a largura (µm) determinados via mensuração da imagem com o programa de análise de imagens, ImageJ 1.52a (National Institutes of Health, Bethesda, MD). Além das suas dimensões, os conídios foram classificados de acordo com os seus formatos, determinados de acordo com a descrição de Sutton (1992) e Tozze Júnior (2006). Cada formato observado recebeu uma denominação: oblongo, com ápices arredondados; cilíndrico, reto, com ápices arredondados; fusiforme, com ápices afinados; elipsoide, extremidades estreitas; clavado, uma extremidade arredondada e outra afinada.

Foi realizada análise de variância (ANOVA), as médias comparadas pelo Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o programa SISVAR 5.6 (FERREIRA, 2003).

### 3.4 Teste de patogenicidade

Os testes de patogenicidade foram realizados em folhas destacadas e em frutos de videira da cultivar “Niágara Rosada”.

#### 3.4.1 Preparo do inóculo

Os isolados foram previamente cultivados em placas de Petri contendo meio de cultura BDA e armazenados em câmara do tipo BOD sob temperatura de 25°C por 7 dias.

Adicionou-se 10 mL de água destilada esterilizada à cultura, em seguida, realizou-se a raspagem do substrato com auxílio de uma alça de Drigalsky, e, posteriormente, a filtragem em duas camadas de gaze. A concentração da suspensão de conídios foi ajustada para  $1 \times 10^6$  conídios/mL com auxílio de uma câmara de Neubauer.

#### 3.4.2 Patogenicidade em folhas destacadas de videira

Foi utilizado o método de folhas destacadas adaptando-se metodologias descritas por Piva (2017) e Poolsawat et al. (2012). Folhas de videiras da cultivar “Niágara Rosada”, assintomáticas, com idade e tamanho semelhantes, foram coletadas a partir de um vinhedo comercial localizado no município de Mariópolis no estado do Paraná. Após a coleta, as folhas foram armazenadas em escuro por 24 horas em temperatura ambiente. Posteriormente, passaram por desinfestação superficial com solução de hipoclorito de sódio a 1% por 1 minuto, em seguida, foram lavadas em água corrente e colocadas para secar em câmara de fluxo laminar. Cada folha de videira foi acondicionada em caixa plástica transparente estéril, contendo papel filtro no fundo, umedecido frequentemente com água destilada esterilizada. Para manter o vigor da folha, o pecíolo foi envolto por um chumaço de algodão embebido em água destilada esterilizada.

A inoculação foi realizada através da pulverização com a suspensão de esporos, referente a cada isolado, na face adaxial da folha até o ponto de molhamento. Folhas do tratamento testemunha foram pulverizadas com água destilada e esterilizada. As caixas foram fechadas e mantidas em BOD a 25°C e fotoperíodo de 12 horas. As avaliações iniciaram-se a partir do aparecimento de sintomas e aos 3, 6, 9, 12 e 15 dias após a inoculação (DAI). A severidade da doença nas folhas foi avaliada em escala diagramática de acordo com o conjunto de diagramas de área padrão (SADs) proposto por Santos e Spózito (2018). Seis diagramas de severidade da antracnose foram utilizados, variando de 1,1 a 27,4%, com valores intermediários de 2,1, 4,3, 8,3 e 15,6%. Os valores de severidade média foram utilizados para o cálculo da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) (CAMPBELL e MADDEN, 1990).

O delineamento foi inteiramente casualizado com 4 repetições e 21 tratamentos (20 isolados + testemunha). Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o programa SISVAR 5.6 (FERREIRA, 2003).

### 3.4.3 Patogenicidade em frutos

A avaliação da patogenicidade em frutos foi realizada adaptando as metodologias descritas por Than et al. (2008), Mello (2012) e Yan et al. (2015). As bagas foram provenientes de vinhedo comercial, localizado no município de Mariópolis no estado do Paraná. As mesmas foram classificadas por tamanho, sem ferimentos e sintomas de doenças. Após a coleta foram armazenadas por 24 horas sob refrigeração a 5°C. Passaram por desinfestação superficial com solução de hipoclorito de sódio a 1% por 1 minuto, em seguida, foram lavadas em água corrente e secas em papel filtro na câmara de fluxo laminar. O acondicionamento das bagas foi realizado em caixas plásticas transparentes e estéreis contendo papel filtro previamente esterelizado no fundo, que, constantemente era umedecido com água destilada esterelizada.

Com uma agulha de seringa de cromatografia, em cada fruto foram realizados superficialmente micro ferimentos na epiderme das bagas. Com uma pipeta automática foi depositada nos frutos 10 µl da suspensão de esporos ( $1 \times 10^6$  esporos/mL). Os frutos do tratamento controle, que também receberam os microferimentos, receberam 10 µl de água estéril. Em seguida, as caixas foram fechadas e acondicionadas em BOD sob temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 horas. Após 9 dias da inoculação, com um paquímetro graduado, foi avaliado o diâmetro das lesões em dois sentidos opostos e calculada a área lesionada. O delineamento foi inteiramente casualizado com 4 repetições e 6 tratamentos (5 isolados de bagas + testemunha). Cada unidade experimental constituía-se de oito bagas inoculadas. Os dados foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o programa SISVAR 5.6 (FERREIRA, 2003).

### 3.5 Atividade antifúngica de óleos essenciais e compostos majoritários sobre os isolados

Foram realizados ensaios *in vitro* para avaliação da atividade antifúngica dos óleos essenciais (OEs) de cravo (*Syzygium aromaticum*), canela (*Cinnamomum cassia*) e eucalipto (*Eucalyptus globulus*) no controle de *Colletotrichum* spp. Também foram implementados testes com os compostos eugenol, cinamaldeído e eucaliptol para verificação da eficácia dos mesmos no controle do fitopatógeno. Tanto os OEs quanto os compostos foram obtidos comercialmente da empresa Quinari®.

Conforme com o laudo técnico fornecido pelo fabricante, o OE de cravo foi obtido a partir das suas folhas e botões, o de canela a partir da casca e o de eucalipto das folhas

e galhos, todos pelo método de extração de arraste a vapor. Para identificação dos componentes químicos a técnica utilizada foi de Cromatografia Gasosa (CG), acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM).

Verifica-se seis constituintes no óleo essencial de cravo, sendo o eugenol (87,7%) e o cariofileno (8,5%) os compostos majoritários (Quadro 1). O óleo essencial de eucalipto composto por doze componentes, sendo, o eucaliptol (57,57%) e o ocimeno (19,19%) como constituintes principais (Quadro 2). Em relação aos compostos eugenol, cinamaldeído e eucaliptol, de acordo com os laudos, os mesmos apresentaram 95% de pureza ou mais. A cromatografia do óleo essencial de canela não foi disponibilizada pela empresa.

QUADRO 1. Composição química do óleo essencial de folhas e botões de cravo (*Eugenia caryophyllus*). Quinarí®, 2021.

<b>Componente</b>	<b>Teor (%)</b>
eugenol	87,7
$\beta$ -cariofileno	8,5
humuleno	2,1
elemol	1,0
acetato de eugenila	0,2
$\beta$ -selineno	0,1
outros	0,3

QUADRO 2. Composição química do óleo essencial de folhas e galhos de eucalipto (*Eucalyptus globulus*). Quinarí®, 2021.

<b>Componente</b>	<b>Teor (%)</b>
eucaliptol	57,57
o-cimeno	19,19
$\alpha$ -pineno	7,55
$\alpha$ -terpineol	4,64
$\gamma$ -terpineno	4,02
$\alpha$ -felandreno	2,01
$\beta$ -mirceno	1,77
terpinen-4-ol	0,97
$\beta$ -pineno	0,67
trans- $\beta$ -ocimeno	0,64
$\alpha$ -terpineno	0,31
pinocarveol	0,21

Os experimentos foram realizados separadamente e em períodos diferentes, em função do espaço para incubação e tempo necessário para realização das avaliações. As concentrações de OE foram definidas com base em testes preliminares, que variaram de 0, 0,25, 0,5, 1 e 2% e 0, 100, 250, 500, 750, 1000, 2000 e 3000 ppm. Foi identificada a concentração que inibiu completamente o crescimento micelial dos fungos e, a partir desta, as demais.

O efeito do óleo essencial e dos compostos majoritários foi considerado "fungistático" quando o desenvolvimento do patógeno foi menor ou nulo comparado a testemunha e "fungicida" quando não houve qualquer crescimento.

### 3.5.1 Avaliação da eficácia de óleos essenciais de cravo e canela no controle *in vitro* de *Colletotrichum* spp.

Na avaliação da eficácia dos OEs de cravo e canela no controle *in vitro* de *Colletotrichum* spp. as concentrações testadas foram 0, 100, 250 e 500 ppm. Para a testemunha, utilizou-se apenas o meio de cultura BDA. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 4 x 16 (óleos x concentrações x isolados) e cinco repetições.

Com auxílio de uma pipeta automática as diferentes concentrações dos OEs foram pipetadas e incorporadas ao meio de cultura BDA fundente. Os volumes dos óleos foram calculados em relação a quantidade de meio de cultura utilizado. Realizou-se a homogeneização com um bastão de vidro por 3 minutos. Posteriormente, os meios foram vertidos em placas de Petri descartáveis estéreis de 80 mm de diâmetro. Após a solidificação do meio, discos de micélios (5 mm) de colônias dos isolados foram transferidos para o centro das placas, as quais foram vedadas com filme de PVC e incubadas em câmara BOD à temperatura de 25°C no escuro. Todos os procedimentos foram realizados em ambiente asséptico, na câmara de fluxo laminar.

A avaliação do crescimento micelial consistiu na medição diária do diâmetro das colônias (média de duas medidas diametralmente opostas) utilizando um paquímetro graduado, iniciando-se 24 horas após o início do trabalho e se estendendo até que uma das colônias do tratamento controle atingiu a borda da placa. Com a média dos resultados obtidos, foi determinado o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) e a porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC).

Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, utilizando o programa SISVAR 5.6 (FERREIRA, 2003).

### 3.5.2 Avaliação da eficácia do óleo essencial de eucalipto no controle *in vitro* de *Colletotrichum* spp.

Para a avaliação da eficácia do OE de eucalipto no controle *in vitro* de *Colletotrichum* spp. foram utilizadas as concentrações de 0, 1 e 2%. Para a testemunha utilizou-se apenas o meio de cultura BDA. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3 x 16 (concentrações x isolados) e cinco repetições. Os procedimentos metodológicos e as avaliações realizadas foram similares ao descrito no item 3.5.1.

### 3.5.3 Avaliação da eficácia dos compostos eugenol e cinamaldeído no controle *in vitro* de *Colletotrichum* spp.

Para avaliar as atividades antifúngicas dos compostos eugenol e cinamaldeído em *Colletotrichum* spp., foram utilizadas as concentrações 0, 100, 250 e 500 ppm, e, para testemunha, utilizou-se apenas o meio de cultura. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 4 x 16 (compostos x concentrações x isolados) e cinco repetições. Todos os procedimentos metodológicos e as avaliações realizadas foram similares ao descrito no item 3.5.1.

### 3.5.4 Avaliação da eficácia do composto eucaliptol no controle *in vitro* de *Colletotrichum* spp.

No teste da atividade antifúngica do composto eucaliptol no controle *in vitro* de *Colletotrichum* spp. foram utilizadas as concentrações de 0, 1 e 2%. A testemunha consistiu de placas contendo somente o meio BDA. Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, com cinco repetições, em esquema fatorial 3 x 16 (concentrações x isolados). A metodologia de aplicação das concentrações do composto e as formas de avaliações estão descritas no item 3.5.1.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Culturas monospóricas

Foram obtidos 50 isolados monospóricos, sendo 13 do Mato Grosso do Sul, 4 do Paraná, 15 do Rio Grande do Sul e 18 de Santa Catarina. Mediante a avaliação morfológica visual, alguns isolados foram descartados pois claramente não estavam associados ao fungo patogênico estudado.

Para o ensaio de caracterização cultural e morfológica, do total dos isolados obtidos, 7 foram desconsiderados, sendo 4 da região Sul (RS, PR, SC) e 3 do Mato Grosso do Sul, pois os mesmos apresentavam características típicas de *Pestalotia* spp. No decorrer dos experimentos, devido à perda de viabilidade, 20 isolados foram utilizados nos ensaios de patogenicidade e 16 nos testes *in vitro*.

### 4.2 Caracterização cultural e morfológica de isolados provenientes de videiras, cultivar Niágara rosada, de diferentes regiões do Mato Grosso do Sul, Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina

Na caracterização cultural e morfológica dos isolados, foram realizados dois ensaios, um com os isolados provenientes do Mato Grosso do Sul (MS) e outro com os isolados obtidos nos estados do Paraná (PR), Santa Catarina (SC) e Rio Grande do Sul (RS).

Dos isolados oriundos da região Sul (RS, PR, SC) foram utilizados 33. Destes, 12 foram provenientes de folhas, 13 de pecíolos e 8 de bagas. Na amostra procedente do Mato Grosso do Sul (MS) foram avaliados 10 isolados, todos oriundos de folhas de videiras. As bagas e pecíolos não apresentaram sintomas característicos da doença.

A nomeação foi realizada de acordo com a origem geográfica, órgão de isolamento, ano e mês de coleta. As duas primeiras letras maiúscula e o número correspondem ao estado e a propriedade onde foram coletados, seguidas da letra inicial da parte da planta da qual foi obtido o isolamento e a repetição a qual corresponde (Quadro 3 e Quadro 4).

QUADRO 3. Designação, origem geográfica, órgão de isolamento e ano/mês de coleta dos isolados fúngicos de videiras (*Vitis labrusca*) com sintomas de antracnose provenientes dos Estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Dourados-MS, UFGD, 2022.

<b>Isolado</b>	<b>Local de Origem</b>	<b>Órgão de Isolamento</b>	<b>Ano/ mês coleta</b>
<b>RS1F1R1</b>	Nonoai-RS	Folha	2019/fevereiro
<b>PR1F4</b>	Mariópolis-PR	Folha	2019/fevereiro
<b>RS1F5R1</b>	Nonoai-RS	Folha	2019/fevereiro
<b>SC2F2R2</b>	Abelardo Luz-SC	Folha	2019/fevereiro
<b>SC1F3R2</b>	Abelardo Luz-SC	Folha	2019/fevereiro
<b>SC2F2R1</b>	Abelardo Luz-SC	Folha	2019/fevereiro
<b>RS1F1R2</b>	Nonoai-RS	Folha	2019/fevereiro
<b>SC1F1R3</b>	Abelardo Luz-SC	Folha	2019/fevereiro
<b>RS3F2</b>	Três de Maio-RS	Folha	2018/dezembro
<b>SC2F3R2</b>	Abelardo Luz-SC	Folha	2019/fevereiro
<b>SC2F3R1</b>	Abelardo Luz-SC	Folha	2019/fevereiro
<b>SC1F1R4</b>	Abelardo Luz-SC	Folha	2019/fevereiro
<b>SC1P4R5</b>	Abelardo Luz-SC	Pecíolo	2019/fevereiro
<b>SC1P1R1</b>	Abelardo Luz-SC	Pecíolo	2019/fevereiro
<b>RS1P3R2</b>	Nonoai-RS	Pecíolo	2019/fevereiro
<b>SC1P4R3</b>	Abelardo Luz-SC	Pecíolo	2019/fevereiro
<b>SC2P1R3</b>	Abelardo Luz-SC	Pecíolo	2019/fevereiro
<b>RS1P2R2</b>	Nonoai-RS	Pecíolo	2019/fevereiro
<b>PR1P1</b>	Mariópolis-PR	Pecíolo	2019/fevereiro
<b>SC1P4R2</b>	Abelardo Luz-SC	Pecíolo	2019/fevereiro
<b>SC1P2R2</b>	Abelardo Luz-SC	Pecíolo	2019/fevereiro
<b>SC1P2R1</b>	Abelardo Luz-SC	Pecíolo	2019/fevereiro
<b>SC1P5R4</b>	Abelardo Luz-SC	Pecíolo	2019/fevereiro
<b>SC2P1R4</b>	Abelardo Luz-SC	Pecíolo	2019/fevereiro
<b>SC1P4R1</b>	Abelardo Luz-SC	Pecíolo	2019/fevereiro
<b>RS2B1R1</b>	Flores da Cunha-RS	Baga	2019/fevereiro
<b>RS1B2R2</b>	Nonoai-RS	Baga	2018/dezembro
<b>RS2B3R1</b>	Flores da Cunha-RS	Baga	2019/fevereiro
<b>RS1B3R2</b>	Nonoai-RS	Baga	2019/fevereiro
<b>RS1B1</b>	Nonoai-RS	Baga	2018/dezembro
<b>RS2B1R2</b>	Flores da Cunha-RS	Baga	2019/fevereiro
<b>RS1B3R1</b>	Nonoai-RS	Baga	2019/fevereiro
<b>RS1B2R1</b>	Nonoai-RS	Baga	2019/fevereiro

QUADRO 4. Designação, origem geográfica, órgão de isolamento e ano/mês de coleta dos isolados fúngicos de videiras (*Vitis labrusca*) com sintomas de antracnose provenientes do Estado do Mato Grosso do Sul. Dourados-MS, UFGD, 2022.

<b>Isolado</b>	<b>Local de Origem</b>	<b>Órgão de Isolamento</b>	<b>Ano/ mês coleta</b>
<b>MS1F1R4</b>	Dourados	Folha	Dezembro/2019
<b>MS4F5R2</b>	Itaporã	Folha	Dezembro/2019
<b>MS4F5R1</b>	Itaporã	Folha	Dezembro/2019
<b>MS2F3R1</b>	Itaporã	Folha	Dezembro/2019
<b>MS3F1R2</b>	Itaporã	Folha	Dezembro/2019
<b>MS2F3R2</b>	Itaporã	Folha	Dezembro/2019
<b>MS2F1R3</b>	Itaporã	Folha	Dezembro/2019
<b>MS3F2R3</b>	Itaporã	Folha	Dezembro/2019
<b>MS4F4R2</b>	Itaporã	Folha	Dezembro/2019
<b>MS4F1R3</b>	Itaporã	Folha	Dezembro/2019

Na avaliação cultural dos isolados, tanto da região Sul como do Estado do Mato Grosso do Sul, o isolamento a partir de lesões típicas de antracnose em meio de cultura BDA, resultou em colônias heterogêneas. Houve grande variação na morfologia das colônias e dos conídios. Considerando o padrão morfológico e as observações e descrições obtidas, as culturas dos isolados provenientes dos Estados do Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina foram agrupadas em oito grupos distintos e as do Mato Grosso do Sul em quatro grupos (Quadro 5, Quadro 6, Figura 5, Figura 6). Não foi possível pelas características avaliadas diferenciar os isolados amostrados seja por origem geográfica ou por hospedeiro de origem, evidenciando variabilidade tanto em isolados da mesma região quanto em isolados de regiões distintas. No entanto, foi observado um padrão de coloração das colônias entre o grupo 2 da região Sul com o grupo 1 do Estado do Mato Grosso do Sul. Também foi verificado o mesmo padrão de coloração entre os grupos de número 3 de ambas regiões.

QUADRO 5. Características culturais de isolados fúngicos obtidos de videiras (*Vitis labrusca*) com sintomas de antracnose provenientes dos Estados do Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina. Dourados-MS, UFGD, 2022.

Grupo	Isolados	Cor da colônia	
		Anverso	Verso
1	RS1F1R1	Cinza escuro/branco	Branco/cinza
	PR1F4		
	SC1P4R1		
2	RS1F5R1	Cinza claro/laranja	Laranja/branco
	RS1F1R2		
	RS1P3R2		
	RS1P2R2		
	SC1P2R2		
	SC1P2R1		
	SC1P5R4		
	SC2P1R4		
3	SC2F2R2	Cinza claro	Cinza escuro/branco
	SC2F2R1		
	SC1P1R1		
	SC1P4R5		
4	SC1F1R3	Salmão	Salmão
5	RS3F2	Laranja/branco	Laranja/branco
	SC1F1R4		
6	RS2B3R1	Marrom/branco	Marrom
7	SC1F3R2	Cinza claro/salmão	Cinza escuro/salmão
	SC2F3R2		
	SC2F3R1		
	SC1P4R3		
	SC2P1R3		
	PR1P1		
SC1P4R2			
8	RS2B1R1	Cinza claro/branco	Salmão/cinza claro
	RS1B2R2		
	RS1B3R2		
	RS1B1		
	RS2B1R2		
	RS1B3R1		
RS1B2R1			

No grupo 1 da região Sul foram agrupados três isolados. As colônias apresentaram no centro coloração cinza escuro e branco ao seu redor, com o reverso branco e cinza; textura lisa, margem regular, micélio cotonoso, formação de halos e ausência de esporulação. O grupo 2 foi formado por oito isolados com colônias de coloração cinza

claro e laranja na parte superior e no verso laranja com branco; aparência lisa e margem regular. O micélio variou entre cotonoso e ralo, com formação de peritécios e halos. A esporulação ocorreu de forma distribuída e a massa conidial era de coloração laranja e os conídios apresentaram formato oblongo. No terceiro grupo, formado por quatro isolados, as colônias no anverso apresentavam coloração cinza claro e o verso cinza escuro com bordas brancas; aparência lisa, margem regular, micélio cotonoso e formação de halos. Neste grupo somente um isolado formou peritécios (SC1P1R1). Os conídios apresentaram formatos elipsoides. Um isolado com micélio de coloração salmão (anverso e verso) correspondeu ao quarto grupo, a aparência era lisa, margem regular e o micélio cotonoso, sem formação de halos, peritécios e setores. Os conídios apresentaram formatos que variaram de elipsoide a oblongo. No quinto grupo, formado por dois isolados, as colônias tanto no anverso como no verso possuíam no centro coloração laranja e ao redor micélio branco, aparência lisa, margem irregular, com formação de peritécios e halos. A massa de conídios era de coloração laranja, produzida de forma distribuída, com conídios de formatos clavados e oblongos. O grupo 6 contou com apenas um isolado, a colônia de aparência enrugada, margem irregular, com micélio ralo e coloração no anverso marrom com branco e no verso marrom, os conídios pequenos e de formato oblongo. No sétimo grupo a coloração das colônias no anverso predominou o cinza claro e salmão com o verso cinza escuro e salmão, os conídios possuíam formatos oblongos e alguns cilíndricos. Sete isolados se enquadraram neste grupo, as colônias eram de margens regulares, aparência lisa, algumas com formação de halos e peritécios (SC2F3R2, SC1P4R3, SC1P4R2). A massa conidial de cor laranja e com padrão de esporulação concentrado, os conídios de formato oblongo e cilíndrico. O oitavo grupo, também com sete isolados, todos provenientes de bagas, as colônias na parte superior apresentavam coloração de cinza claro e borda branca, e na parte inferior salmão e cinza claro. Foi possível observar a formação de halos e os conídios todos com formatos fusiformes. Dois isolados formaram peritécios (RS1B1 e RS1B3R1).

Em geral, nos isolados provenientes da região Sul, predominou a cor laranja para coloração da massa de conídios e o padrão de esporulação variou entre concentrado (apenas no centro da placa) e distribuído (toda a placa), no entanto, 3 isolados não esporularam. Todos apresentaram aparência lisa, com exceção do RS2B3R1 (Grupo 6), o qual apresentou aparência enrugada. Em relação a margem, 91% dos isolados apresentaram margem regular. Quanto à densidade do micélio, 42% apresentou aspecto cotonoso e 58% aspecto ralo. Em dois isolados ocorreu a formação de setores (RS3F2 e

RS1P2R2) e a maioria das colônias formaram halos (72%). A presença de peritécios variou entre os isolados, ou seja, a formação dos mesmos não foi exclusiva a isolados específicos de uma região ou parte da planta. Em relação a coloração das colônias, houve variação entre branco, cinza e salmão.

QUADRO 6. Características culturais de isolados de videiras (*Vitis labrusca*) com sintomas de antracnose e provenientes do Estado do Mato Grosso do Sul. Dourados-MS, UFGD, 2022.

Grupo	Isolados	Cor da colônia	
		Anverso	Verso
1	MS4F5R2	Cinza claro/laranja	Laranja/branco
	MS2F1R3		
2	MS1F1R4	Salmão/cinza	Vermelho/castanho
	MS4F5R1		
	MS2F3R1		
3	MS3F1R2	Cinza claro	Cinza escuro/branco
	MS2F3R2		
4	MS4F1R3	Cinza claro/salmão	Branco/salmão
	MS3F2R3		
	MS4F4R2		

Na avaliação cultural dos isolados de Mato Grosso do Sul, as colônias quanto à coloração, variaram de cinza claro a laranja. No grupo 1, foram reunidos dois isolados. As colônias apresentaram no anverso coloração cinza claro com laranja no centro e no verso as cores laranja e branco; margem regular, micélio cottonoso, formação de halos e peritécios. Os conídios de formatos oblongos e cilíndricos. No grupo 2, com três isolados, as colônias no anverso eram de coloração salmão e cinza e, no verso, vermelho com castanho escuro no centro; bordas regulares, micélio ralo, aparência enrugada e conídios pequenos e elipsoides. Somente o isolado MS4F5R1 formou peritécios. No grupo 3, os isolados apresentavam colônias de coloração cinza claro no anverso e no verso cinza escuro com branco, margem irregular, micélio cottonoso com formação de halos e conídios pequenos de formatos elipsoides. O isolado MS3F1R2 formou peritécios. O quarto e último grupo, com três isolados, teve predomínio de coloração das colônias cinza claro e salmão no anverso e no reverso branco com salmão, micélio cottonoso, margem irregular e conídios com formatos cilíndricos e oblongos. Todos os isolados desse grupo formaram peritécios.

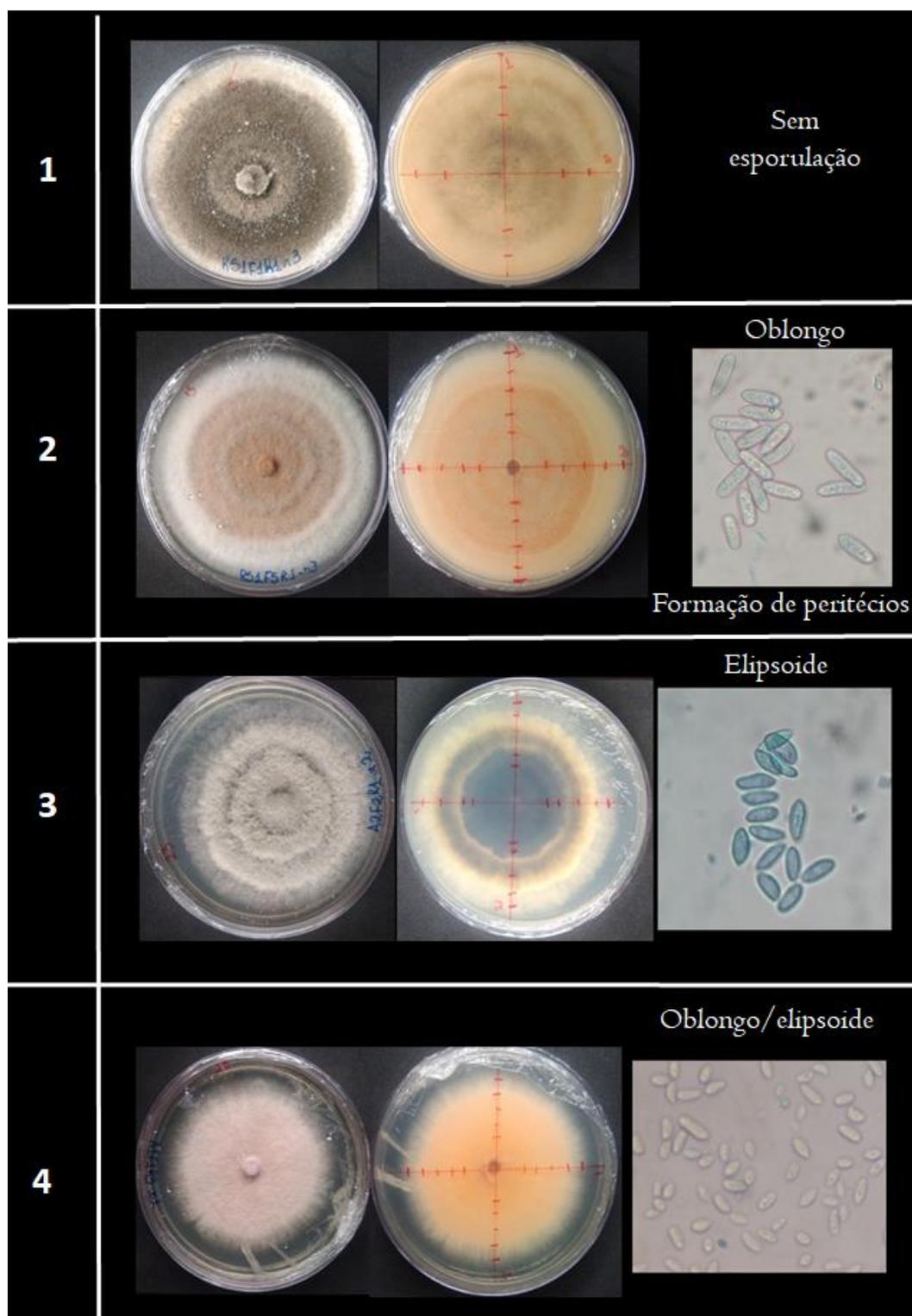


FIGURA 5. Coloração das colônias (anverso e verso) e formatos de conídios de grupos de *Colletotrichum* spp. isolados de videiras (*Vitis labrusca*) com sintomas de antracnose provenientes dos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Dourados-MS, UFGD, 2022. (...continua...)

FIGURA 5, Cont.

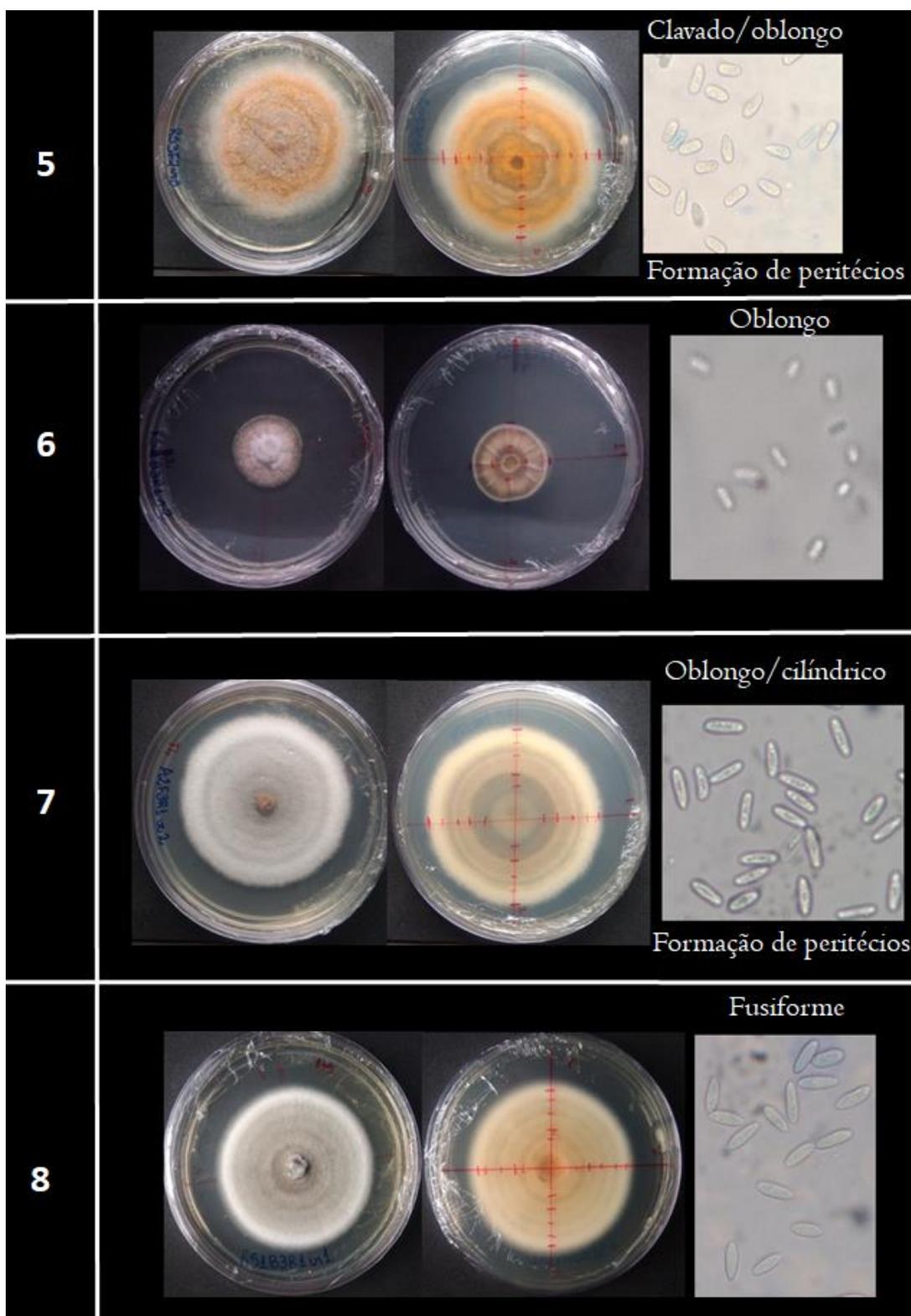


FIGURA 5. Coloração das colônias (anverso e verso) e formatos de conídios de grupos de *Colletotrichum* spp. isolados de videiras (*Vitis labrusca*) com sintomas de antracnose provenientes dos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Dourados-MS, UFGD, 2022.

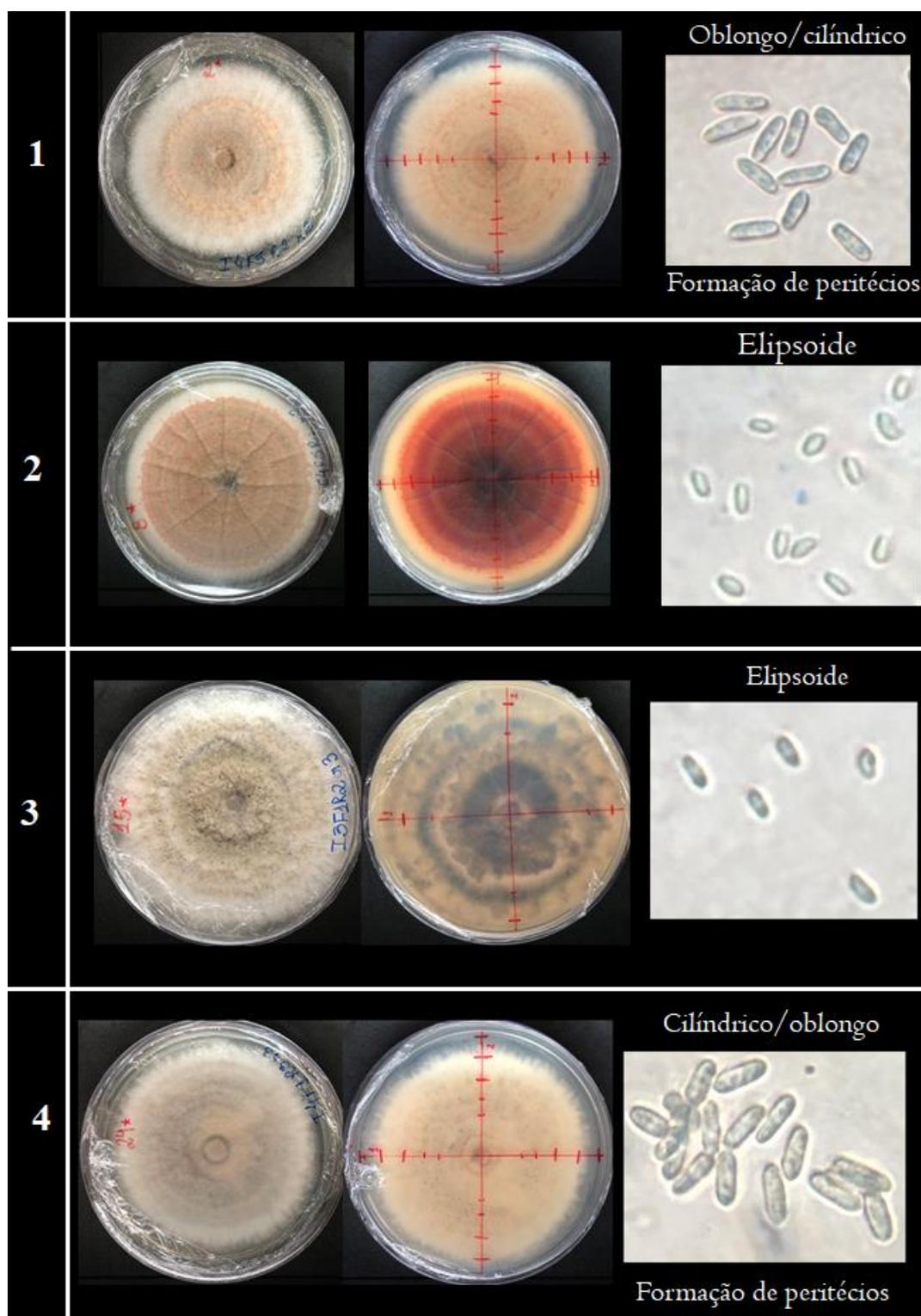


FIGURA 6. Coloração das colônias (anverso e verso) e formatos de conídios de grupos de *Colletotrichum* spp. isolados de videiras (*Vitis labrusca*) com sintomas de antracnose provenientes do estado do Mato Grosso do Sul. Dourados-MS, UFGD, 2022.

No geral, para os isolados do Mato Grosso do Sul, também predominou o laranja para a cor da massa de conídios e o padrão de esporulação foi muito e distribuído. Em relação à aparência e ao tipo de margem, 70% dos isolados apresentaram aparência lisa e margem regular. O micélio cotonoso prevaleceu entre os isolados, correspondendo a 90%. Houve variação na presença de peritécios e somente um isolado não formou halos (MS2F3R2). Dois isolados formaram setores, sendo eles, o MS3F2R3 e o MS4F4R2.

As características detectadas neste trabalho corroboram aos observados por Bonett et al. (2010), que verificaram variabilidade na coloração em colônias de *Colletotrichum* spp. obtidos a partir de frutos e hortaliças. De acordo com os autores, a coloração das colônias fúngicas variou entre branco, salmão e tons de cinza. Tozze Júnior et al. (2015), na caracterização e identificação de isolados de *Colletotrichum* spp. de frutíferas, também relatam que os micélios foram predominantemente de coloração cinza claro no anverso e no verso das colônias prevaleceu o castanho, porém, alguns isolados produziram colônias de coloração salmão e também cinza. Para massa conidial predominou a cor laranja.

Resultados similares foram encontrados por Silva et al. (2018) no estudo da diversidade morfológica de isolados de *Colletotrichum* spp. associados à antracnose da pimenta-de-cheiro (*Capsicum chinense* Jacq.). Segundo os autores, para 87,5% dos isolados avaliados, a cor do micélio foi cinza com o reverso variando entre branco, cinza, cinza escuro, marrom escuro e laranja, os demais isolados produziram colônias com micélio branco e reverso variando entre branco e laranja.

Segundo Marin-Felix et al. (2017), as características culturais das colônias de *Colletotrichum* spp. desenvolvidas em meio BDA são de aparência plana (lisas), com margem regular a irregular e coloração cinza escuro no centro. O micélio aéreo, quando presente, é de cor branca ou verde oliva. O verso da colônia inicialmente é branco e ao longo do seu crescimento varia para outras colorações como cinza, verde oliva ou cinza escuro, anéis concêntricos (halos) também podem ser observados.

Bailey e Jeger (1992) explicam que essas variações apresentadas pelas colônias do patógeno podem ser atribuídas ao genótipo de cada isolado, cuja expressão fenotípica está associada ao ambiente de cultivo, assim como a biossíntese de metabólitos secundários. Para Lopes (2013), as variações na topografia e coloração das colônias, se deve ao fato do gênero *Colletotrichum* spp. apresentar grande diversidade para estas características, porém, a identificação dessas variáveis é importante como parte de um conjunto de dados morfológicos que auxiliarão na identificação do patógeno a nível de espécie.

No presente trabalho, a presença de distintos morfotipos de colônias, provenientes das diferentes regiões geográficas, indica a possibilidade de que os isolados pertençam a diferentes espécies. De acordo com Sutton (1992), em meio de cultura, *Colletotrichum gloeosporioides* forma colônias variáveis, de coloração branco gelo a cinza escuro, com quantidade variável de micélio aéreo. É variável também a produção de estruturas reprodutivas em meio de cultura. Outro complexo importante e com características culturais semelhantes às encontradas neste estudo é o *Colletotrichum acutatum*, o qual apresenta colônias inicialmente brancas e depois ficam cobertas por uma massa de conídios salmão a laranja (DAMM et al., 2012).

Uma espécie que, possivelmente, pode estar presente dentre os isolados avaliados é *Elsinoe ampelina*. Li et al. (2021) relatam que as colônias deste patógeno, em meio BDA, apresentam alta variabilidade de cor, incluindo tons de vermelho, amarelo, marrom, preto, branco, coral e laranja escuro. Segundo Santos et al. (2018), é uma espécie com grande diversidade de coloração das colônias, que pode variar de branco a marrom escuro, sua textura é rugosa, o micélio aéreo é ralo ou ausente e não há presença de massas de esporos, características semelhantes ao do isolado RS2B3R1.

Quanto a caracterização das colônias em relação ao diâmetro final e velocidade de crescimento, de acordo com os resultados, houve diferenças significativas entre os isolados provenientes tanto da região sul como do Mato Grosso do Sul, indicando que a população de patógenos avaliada é heterogênea, com grande diversidade quanto aos locais (regiões) e parte da planta em que foram identificados. Foi possível observar que para as variáveis analisadas, os resultados são diferentes mesmo entre isolados, provenientes de um mesmo Estado ou propriedade.

Para os isolados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, o DFC médio foi de 63,65 mm. Os isolados de folha, RS1F1R1, PR1F4, SC2F2R2, RS1F1R2 e de pecíolo SC1P1R1, RS1P3R2 e SC1P4R1, apresentaram os maiores valores de DFC (80,00 mm). Os isolados de bagas tiveram diâmetros menores, que variaram de 51,66 a 53,66 mm. O menor valor de DFC foi verificado no isolado de baga RS2B3R1 (Grupo 6) com 12,50 mm. O IVCM médio diário foi de 4,23 e os maiores valores de velocidade de crescimento foi observado nos isolados RS1F1R1, PR1F4 e SC1P4R1 (Grupo 1) que variaram de 6,32 a 6,43. Os isolados provenientes de bagas apresentaram as menores velocidades de crescimento, com variações de 3,41 a 3,60. O menor valor de IVCM foi do isolado RS2B3R1 com 0,50 de IVCM diário (Quadro 7).

Em relação aos resultados para produção e dimensionamento de conídios dos isolados da região Sul, o valor médio encontrado para o comprimento foi de 13,47  $\mu\text{m}$  e para largura 4,24  $\mu\text{m}$  (Quadro 8). Foi possível observar que dentro dos grupos formados, houve homogeneidade quanto ao formato dos conídios, porém, em relação ao comprimento e largura dos mesmos houve grande variação nos valores. Os maiores valores para comprimento variaram de 14,75 a 17,00  $\mu\text{m}$ , correspondendo a formatos oblongos, cilíndricos e clavados. Os formatos fusiformes e elipsoides variaram de 6 a 13,55  $\mu\text{m}$  de comprimento. A largura dos conídios variou de 1,49 a 6,24  $\mu\text{m}$ . O menor valor, tanto no comprimento quanto na largura, foi correspondente ao isolado RS2B3R1, o qual produziu conídios unicelulares, oblongos a ovoides e pequenos (3,21  $\times$  1,49  $\mu\text{m}$ ), característicos a *Elsinoe ampelina*. Em relação à forma dos conídios, dentre os isolados analisados, aproximadamente 43% apresentaram formatos oblongos, 21% fusiformes, 9% elipsoides, 3% cilíndricos, 15% apresentaram variações entre as formas e 9% não produziu esporos (Figura 5).



FIGURA 7. Diferentes formas de conídios observados nos isolados de videiras (*Vitis labrusca*) com sintomas de antracnose, provenientes dos Estados do Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Mato Grosso do Sul: (A) oblongos, reto, com ápices arredondados; (B) cilíndrico, retos, ápices arredondados; (C) fusiforme, reto, com ápices afinados; (D) elipsoide, extremidades estreitas; (E) clavado, reto, uma extremidade arredondada e outra afinada. Dourados-MS, UFGD, 2022.

QUADRO 7. Diâmetro final da colônia (DFC) e índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) de isolados de videiras (*Vitis labrusca*) provenientes dos Estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul com sintomas de antracnose. Dourados-MS, UFGD, 2022.

<b>Grupo</b>	<b>Isolado</b>	<b>DFC (mm)</b>	<b>IVCM</b>
1	RS1F1R1	80,00 a*	6,43 a
1	PR1F4	80,00 a	6,54 a
1	SC1P4R1	80,00 a	6,32 a
2	RS1F5R1	75,00 b	4,76 c
2	RS1F1R2	80,00 a	5,09 b
2	RS1P3R2	80,00 a	5,06 b
2	RS1P2R2	71,33 c	4,63 c
2	SC1P2R2	67,00 d	4,34 d
2	SC1P2R1	69,00 c	4,48 c
2	SC1P5R4	69,83 c	4,58 c
2	SC2P1R4	62,00 e	4,08 d
3	SC2F2R2	80,00 a	5,30 b
3	SC2F2R1	65,33 d	4,19 d
3	SC1P4R5	63,16 e	4,12 d
3	SC1P1R1	80,00 a	4,70 c
4	SC1F1R3	65,00 d	4,20 d
5	RS3F2	58,66 f	3,84 e
5	SC1F1R4	58,16 f	3,78 e
6	RS2B3R1	12,50 i	0,50 g
7	SC1F3R2	56,66 g	3,73 e
7	SC2F3R2	62,50 e	4,01 d
7	SC2F3R1	62,50 e	4,09 d
7	SC1P4R3	67,33 d	4,43 c
7	SC2P1R3	61,16 e	3,98 d
7	PR1P1	56,16 g	3,67 e
7	SC1P4R2	66,00 d	4,29 d
8	RS2B1R1	53,50 h	3,46 f
8	RS1B2R2	51,83 h	3,41 f
8	RS1B3R2	53,50 h	3,49 f
8	RS1B1	55,16 g	3,60 f
8	RS2B1R2	51,83 h	3,45 f
8	RS1B3R1	53,66 h	3,57 f
8	RS1B2R1	51,66 h	3,47 f
<b>Média Geral</b>		63,65	4,23
<b>CV %</b>		3,57	3,80

\* As médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott-Knott a 5%.

QUADRO 8. Características morfológicas dos conídios produzidos pelos isolados de videiras (*Vitis labrusca*) com sintomas de antracnose e provenientes dos Estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Dourados-MS, UFGD, 2022.

<b>Conídios</b>				
<b>Grupo</b>	<b>Isolado</b>	<b>Formato</b>	<b>Comprimento (µm)*</b>	<b>Largura (µm)</b>
1	RS1F1R1	Sem esporulação	-	-
1	PR1F4	Sem esporulação	-	-
1	SC1P4R1	Sem esporulação	-	-
2	RS1F5R1	Oblongo	16,54 a	4,86 b
2	RS1F1R2	Oblongo	15,77 a	4,12 c
2	RS1P3R2	Oblongo	16,56 a	5,09 b
2	RS1P2R2	Oblongo	16,90 a	4,57 b
2	SC1P2R2	Oblongo	15,84 a	3,92 c
2	SC1P2R1	Oblongo	16,60 a	5,92 a
2	SC1P5R4	Oblongo	16,02 a	5,15 b
2	SC2P1R4	Oblongo	15,71 a	5,52 a
3	SC2F2R2	Elipsoide	8,16 d	3,16 c
3	SC2F2R1	Elipsoide	6,09 e	2,24 d
3	SC1P4R5	Cilíndrico	15,29 a	4,08 c
3	SC1P1R1	Elipsoide	6,00 e	2,44 d
4	SC1F1R3	Oblongo/elipsoide	7,43 d	3,25 c
5	RS3F2	Clavado/Oblongo	15,51 a	6,24 a
5	SC1F1R4	Clavado/Oblongo	13,71 b	5,09 b
6	RS2B3R1	Oblongo	3,21 f	1,49 d
7	SC1F3R2	Oblongo	15,39 a	4,18 c
7	SC2F3R2	Oblongo	17,00 a	4,44 b
7	SC2F3R1	Oblongo/cilíndrico	14,75 a	4,18 c
7	SC1P4R3	Oblongo/cilíndrico	16,31 a	4,81 b
7	SC2P1R3	Oblongo	15,24 a	5,15 b
7	PR1P1	Oblongo	16,57 a	5,10 b
7	SC1P4R2	Oblongo	15,60 a	4,98 b
8	RS2B1R1	Fusiforme	13,55 b	3,80 c
8	RS1B2R2	Fusiforme	12,77 b	3,79 c
8	RS1B3R2	Fusiforme	10,53 c	3,36 c
8	RS1B1	Fusiforme	12,47 b	3,76 c
8	RS2B1R2	Fusiforme	13,42 b	4,17 c
8	RS1B3R1	Fusiforme	12,48 b	3,66 c
8	RS1B2R1	Fusiforme	12,77 b	4,59 b
<b>Média Geral</b>			13,47	4,24
<b>CV %</b>			10,55	13,35

As médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott-Knott a 5%; \*Média das dimensões de 60 conídios.

As colônias provenientes dos isolados do Mato Grosso do Sul também foram caracterizadas em relação ao diâmetro final, velocidade de crescimento e a morfologia e dimensionamento dos conídios. Os resultados demonstraram que houve diferenças significativas entre os isolados para todas as características avaliadas. Os resultados para DFC e IVCM foram mais homogêneos (Quadro 9). O DFC médio foi de 70,80 mm, o isolado MS2F3R2 apresentou o menor diâmetro de colônia (35,16 mm), e, conseqüentemente, o menor índice de crescimento diário (1,62), diferindo estatisticamente dos demais. O maior valor de velocidade de crescimento foi do isolado MS3F1R2, com 4,77 de IVCM.

QUADRO 9. Diâmetro final da colônia (DFC) e índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) de isolados de videiras (*Vitis labrusca*) provenientes do Estado do Mato Grosso do Sul. Dourados-MS, UFGD, 2022.

Grupo	Isolado	DFC (mm)	IVCM
1	MS4F5R2	65,33 a	3,29 b
1	MS2F1R3	77,96 a	3,44 b
2	MS1F1R4	65,16 a	2,90 b
2	MS4F5R1	78,53 a	3,51 b
2	MS2F3R1	79,26 a	3,51 b
3	MS3F1R2	80,00 a	4,77 a
3	MS2F3R2	35,16 b	1,62 c
4	MS4F1R3	78,43 a	3,29 b
4	MS3F2R3	71,66 a	3,24 b
4	MS4F4R2	76,46 a	3,40 b
<b>Média Geral</b>		70,80	3,30
<b>CV %</b>		11,86	6,33

\* As médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott-Knott a 5%.

Em relação aos resultados para produção e dimensionamento de conídios, os 10 isolados do Mato Grosso do Sul apresentaram conídios compatíveis com o gênero *Colletotrichum* spp. (Quadro 10). O valor médio encontrado para comprimento de conídios foi de 9,52  $\mu\text{m}$  e para largura 3,10  $\mu\text{m}$ . Os maiores valores para comprimento variaram de 17,18 a 14,38  $\mu\text{m}$ , correspondendo a formatos oblongos e cilíndricos. Os menores valores variaram de 3,39 a 0,81  $\mu\text{m}$  com formatos elipsoides. O grupo 1 e 4 apresentaram os maiores conídios, predominando os formatos oblongos e cilíndricos. Os grupos 2 e 3 formaram conídios elipsoides com menores tamanhos de largura e

comprimento. O menor valor foi correspondente ao isolado MS1F1R4, o qual produziu conídios oblongos e pequenos (0,81  $\mu\text{m}$ ).

QUADRO 10. Características morfológicas dos conídios produzidos pelos isolados de videiras (*Vitis labrusca*) com sintomas de antracnose e provenientes do Estado do Mato Grosso do Sul. Dourados-MS, UFGD, 2022.

<b>Conídios</b>				
<b>Grupo</b>	<b>Isolado</b>	<b>Formato</b>	<b>Comprimento (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Largura(<math>\mu\text{m}</math>)</b>
1	MS4F5R2	Oblongo	14,38 a*	4,45 a
1	MS2F1R3	Cilíndrico/oblongo	16,93 a	4,66 a
2	MS1F1R4	Elipsoide	0,81 c	0,51 b
2	MS4F5R1	Elipsoide	2,22 c	1,26 b
2	MS2F3R1	Elipsoide	3,39 c	1,76 b
3	MS3F1R2	Elipsoide	6,45 b	2,85 b
3	MS2F3R2	Elipsoide	2,43 c	1,23 b
4	MS4F1R3	Cilíndrico/oblongo	17,18 a	4,96 a
4	MS3F2R3	Cilíndrico/oblongo	15,51 a	4,72 a
4	MS4F4R2	Cilíndrico/oblongo	15,93 a	4,59 a
<b>Média Geral</b>			9,52	3,10
<b>CV %</b>			20,47	28,28

\*As médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott-Knott a 5%;

\*\* Média das dimensões de 60 conídios.

Foi observado que um isolado produziu conídio com aspecto semelhante ao do fungo *Elsinoe ampelina* e os demais isolados produziram conídios característicos do gênero *Colletotrichum* spp. De acordo com Marin-Felix et al. (2017) os conídios produzidos pelo gênero *Colletotrichum* spp. são hialinos, de parede lisa, asseptados, com formatos variados, podendo ser cilíndricos, clavados, fusiformes, elipsoidais, ovoides, retos ou curvos, com ápices arredondados ou afinados. Tozze Júnior et al. (2015) explicam que essa variabilidade na morfometria de conídios é bem documentada, sendo um mesmo isolado capaz de apresentar tipos morfológicos distintos, o que dificulta a delimitação precisa entre espécies.

Segundo Weir et al. (2012), dentro de um complexo de uma espécie, as dimensões dos conídios são razoavelmente próximos entre os isolados, independentemente da origem geográfica ou do hospedeiro. As diferenças são geralmente pequenas e as faixas de tamanho geralmente se sobrepõem. Como é o caso do complexo de espécies de *Colletotrichum gloeosporioides*, onde há variação no comprimento e largura dos conídios produzidos pelas espécies pertencentes ao clado. O comprimento médio é de 16,74  $\mu\text{m}$  e

largura 5,1  $\mu\text{m}$  em todo o complexo de espécies. Outra questão é em relação a aparência macroscópica das culturas, que muitas vezes são altamente divergentes dentro de uma espécie (por exemplo, *C. fruticola* e *C. theobromicola*). Em *Colletotrichum gloeosporioides* o tamanho médio da cultura é de 61,56 mm, porém, algumas culturas apresentam crescimento rápido e atingem todo o diâmetro da placa. Para *C. acutatum* a característica morfológica mais conhecida é a forma de seus conídios, que possuem extremidades finas. No entanto, outras formas, como a cilíndrica ou com apenas uma extremidade fina, são frequentemente encontradas. Os conídios dessa espécie são hialinos, de parede lisa, asseptados, fusiformes a cilíndricos, com ápices e bases afinadas, com tamanhos que variam de 12 a 16,5  $\mu\text{m}$  de comprimento e 3,5 a 4,5  $\mu\text{m}$  de largura (DAMM et al., 2012). No presente estudo, foram encontrados esses padrões de formatos, sugerindo, portanto, que alguns isolados podem pertencer aos complexos de *Colletotrichum gloeosporioides* e *C. acutatum*.

Dowling et al. (2020) relatam que os complexos de *C. gloeosporioides* são mais adaptados a infectar tecidos vegetativos (folhas, caules, galhos, pecíolos), contrastando, por exemplo, com o complexo *C. acutatum*, que é mais adaptado à infecção de frutos. Também relatam que algumas espécies de *Colletotrichum* spp., principalmente as pertencentes ao complexo *C. gloeosporioides* podem formar peritécios no tecido do hospedeiro. Desta forma, com base nos dados encontrados na literatura e de acordo com os resultados obtidos para caracterização cultural e morfológica, pode-se propor que os isolados dos grupos 2, 5 e 7 da região Sul, assim como, os isolados dos grupos 1 e 4 do Estado do Mato Grosso do Sul, são pertencentes ao complexo de *C. gloeosporioides*. Os grupos 3, 4 e 8 da região Sul e os grupos 2 e 3 do Estado do Mato Grosso do Sul, compreendem isolados do complexo *C. acutatum*.

Os resultados também são semelhantes para IVCM e DFC, em trabalho realizado por Piva (2017), na caracterização cultural e morfológica de isolados de *Colletotrichum* spp., a média para o DFC dos isolados de *C. acutatum* foi de 54,9 mm e para *C. gloeosporioides*, e a maioria dos isolados apresentou crescimento máximo de 80 mm. O comprimento médio dos conídios dos isolados de *C. acutatum* foi 12,2  $\mu\text{m}$ , enquanto que a largura foi 4,9  $\mu\text{m}$ , e o IVCM médio foi de 1,78 mm/dia. Para *C. gloeosporioides*, o IVCM médio foi de 2,6 mm por dia e os valores médios encontrados para comprimento e largura de conídios foi 14,5  $\mu\text{m}$  e 5,3  $\mu\text{m}$ , respectivamente.

O isolado RS2B3R1 obtido a partir de bagas do Rio Grande do Sul, apresentou conídios com características semelhantes aos do fungo *Elsinoe ampelina*, patógeno

considerado como causador da antracnose da videira. Santos et al. (2018) caracterizaram isolados de *E. ampelina* oriundos do Brasil e da Austrália e verificaram características similares às encontradas neste estudo. Os autores relatam que as colônias desenvolveram-se lentamente e os isolados produziram conídios de dimensões que variaram em 3,50 a 7,01 de comprimento por 1,79 a 3,42  $\mu\text{m}$  de largura. Thind (2015) relata que na fase assexuada *E. ampelina* produz conídios pequenos, hialinos e com paredes mucilaginosas, medindo 3 a 7  $\mu\text{m}$  de comprimento e 2 a 4  $\mu\text{m}$  de largura.

As características culturais encontradas nos 43 isolados mostram-se compatíveis com padrões estabelecidos pela literatura para os complexos de *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* e *Elsinoe ampelina*. Além disso, foi observado que houve diferenças nas características entre isolados de um mesmo local de coleta, como por exemplo os isolados de folhas MS2F1R3 e o MS2F3R2, coletados em Itaporã-MS na mesma propriedade. Para esses isolados, todas as características avaliadas apresentaram diferenças nos resultados, indicando que é possível a ocorrência de duas ou mais espécies parasitando um mesmo hospedeiro. Peres et al. (2003) explicam que a variabilidade dos isolados pode ser influenciada por algum fator intrínseco ao patógeno, genótipo do hospedeiro ou interação entre esses fatores.

Para Tozze Júnior et al. (2015), a ocorrência de duas ou mais espécies parasitando um mesmo hospedeiro dificulta o controle da antracnose, devido ao comportamento diferenciado entre espécies. Os estudos de caracterização, baseado em caracteres morfológicos e moleculares são fundamentais para conhecer a amplitude da variabilidade existente entre isolados de um determinado patógeno. Essas informações são essenciais para entender a relação patógeno-hospedeiro, realizar a correta diagnose da doença e desenvolver estratégias de manejo eficazes no controle.

#### 4.3 Teste de patogenicidade em folhas e bagas

No teste de patogenicidade em folhas, foram utilizados 20 isolados obtidos de tecidos sintomáticos a partir de folhas, pecíolos e bagas. Destes, 1 proveniente do estado do Paraná, 11 de Santa Catarina, 7 do Rio Grande do Sul e 1 do Mato Grosso do Sul. Para os isolados obtidos a partir de bagas, a patogenicidade também foi testada nos frutos, 5 isolados foram utilizados, todos procedentes do estado do Rio Grande do Sul.

Todos os isolados que foram inoculados nas folhas e nas bagas de uvas mostraram-se patogênicos, causando sintomas. O início do aparecimento de sintomas nas

folhas ocorreu três dias após a inoculação e os sintomas nas bagas foram visíveis após seis dias.

No início das avaliações, as lesões nas folhas se caracterizaram por pequenas manchas circulares castanho escuras no limbo foliar. Posteriormente, foram surgindo manchas negras que aumentaram e coalesceram, cobrindo parte da lâmina foliar, principalmente ao longo das nervuras (Figura 6). Em algumas lesões foi possível observar a formação de acérvulos (Figura 7). Nas folhas do tratamento controle não foram observados sintomas de doenças.



FIGURA 8. Sintomas em folhas de videira da cultivar Niágara rosada, inoculadas com o isolado RS1F1R2 aos 3 (A) e 12 (B) dias após a inoculação. Dourados-MS, UFGD, 2022.



FIGURA 9. Sintomas em folha de videira da cultivar Niágara rosada, com formação de acérvulos, 15 dias após a inoculação com o isolado o RS1F5R1. Dourados-MS, UFGD, 2022.

A severidade, expressa pela área foliar lesionada, nas folhas inoculadas não diferiu entre os isolados (Quadro 11). A severidade mínima foi de 4,95% e a máxima

de 17,87%, com média de 9,87%. De acordo com Santos et al. (2018), a antracnose da videira raramente atinge altos níveis de severidade nas folhas e, na inoculação artificial, a severidade da doença foliar pode chegar a 14%. No entanto, em condições de campo, esse valor é frequentemente menor. Para Santos e Spósito (2018), nos vinhedos brasileiros, a maior frequência de valores de severidade fica entre 1,1 a 15,6%. Dos Santos et al. (2020) explicam que tal fato se deve aos sintomas típicos da antracnose, que ocorrem principalmente nas nervuras foliares e causam deformação da lâmina foliar. Embora a infecção ocorra principalmente nas nervuras e áreas adjacentes, o que resulta no baixo percentual de área foliar colonizada, os sintomas causam sérios danos a planta, pois a colonização do patógeno afeta o fluxo de água, a redução da taxa fotossintética e, eventualmente, a morte da folha.

QUADRO 11. Severidade (%) e área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD) em folhas destacadas da cultivar Niágara Rosada, inoculados com diferentes isolados. Dourados-MS, UFGD, 2022.

<b>Isolado</b>	<b>Severidade (%)</b>	<b>AACPD</b>
<b>Testemunha</b>	0,00 a	0,00 b
<b>RS1F5R1</b>	9,95 a	62,70 a
<b>SC2F2R2</b>	12,10 a	49,95 b
<b>SC1F3R2</b>	13,10 a	49,46 b
<b>RS1F1R2</b>	14,90 a	69,00 a
<b>SC2F3R2</b>	14,90 a	85,53 a
<b>SC2F3R1</b>	4,95 a	25,12 b
<b>SC1F1R4</b>	10,27 a	41,40 b
<b>SC1P4R5</b>	6,32 a	38,47 b
<b>SC1P1R1</b>	11,95 a	55,01 a
<b>SC1P4R3</b>	6,57 a	27,75 b
<b>RS1P2R2</b>	5,30 a	39,75 b
<b>PR1P1</b>	17,87 a	93,48 a
<b>SC1P4R2</b>	6,57 a	65,28 a
<b>SC1P5R4</b>	8,57 a	69,11 a
<b>SC2P1R4</b>	15,72 a	95,36 a
<b>RS1B2R2</b>	10,12 a	10,12 b
<b>RS1B3R2</b>	5,30 a	36,03 b
<b>RS1B1</b>	11,95 a	46,72 b
<b>RS1B2R1</b>	13,10 a	66,03 a
<b>MS3F2R3</b>	7,12 a	34,95 b
<b>Média Geral</b>	9,87	50,53
<b>CV %</b>	73,98	70

\*As médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott-Knott a 5%.

Os isolados RS1F5R1, RS1F1R2, SC2F3R2, SC1P1R1, PR1P1, SC1P4R2, SC1P5R4, SC2P1R4 e RS1B2R1 foram os que apresentaram os maiores valores de AACPD, variando de 55,01 a 95,36, portanto, considerados mais agressivos (Quadro 9).

Não houve relação de caracterização morfológica, local de origem e órgão de isolamento entre os grupos quanto a agressividade.

Nas bagas os sintomas foram característicos à podridão da uva madura. As lesões apareceram inicialmente arredondadas, necróticas, de coloração castanho-escuro e circundadas por um halo castanho claro. Posteriormente, as mesmas coalesceram, formando exsudatos de cor laranja, caracterizando a massa conidial do fungo. Em algumas bagas foi possível verificar a formação de micélio cottonoso com rachaduras no pericarpo. A evolução da doença culminou no apodrecimento de algumas bagas (Figura 8).

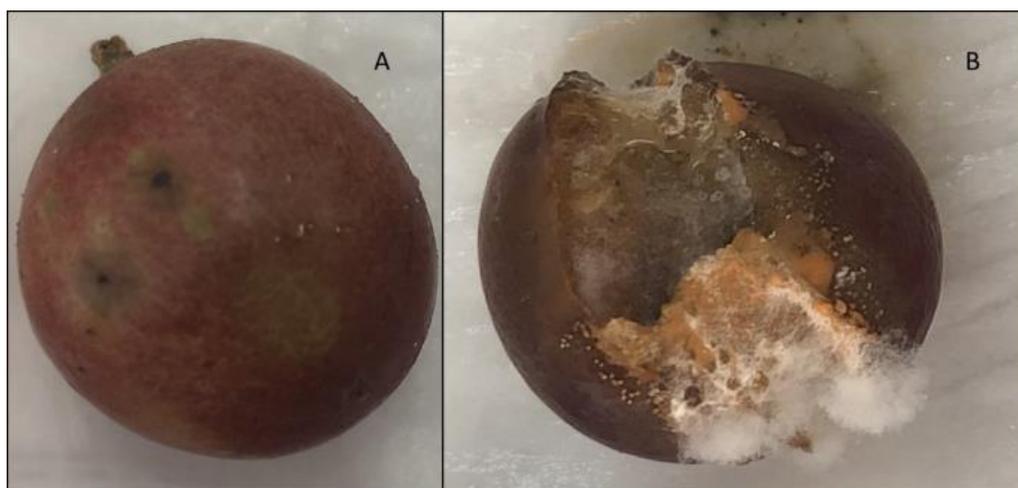


FIGURA 10. Sintomas em bagas da cultivar Niágara rosada, com 6 (A) e 9 (B) dias após a inoculação. Dourados-MS, UFGD, 2022.

Segundo Whitelaw-Weckert et al. (2007), a podridão da uva madura atinge diretamente as bagas, que são suscetíveis ao patógeno em todos os estádios de desenvolvimento, porém os sintomas aparecem somente com o amadurecimento dos frutos. Garrido e Gava (2014) explicam que os sintomas mais evidentes da podridão da uva madura são observados nos cachos na fase de maturação ou em uvas colhidas. Nas bagas surgem manchas circulares, marrom-avermelhadas, que posteriormente, atingem todo o fruto, escurecendo-o. Em condições favoráveis, como alta umidade, aparecem

estruturas reprodutivas do fungo, os acérvulos, na forma de pontuações cinza-escuras concêntricas, das quais exsuda uma massa rósea ou salmão, que são os conídios do fungo. Com a evolução da doença ocorreu o murchamento das bagas.

Para os valores de diâmetro da lesão e área lesionada, houve diferença significativa entre os isolados. O isolado RS1B2R1 ocasionou a maior lesão, e, conseqüentemente, a maior área lesionada, diferindo estatisticamente da testemunha e dos demais (Quadro 12).

QUADRO 12. Diâmetro da lesão e área lesionada em bagas da cultivar Niágara Rosada inoculadas com isolados de *Colletotrichum* spp. Dourados-MS, UFGD, 2022.

Isolado	Diâmetro da lesão	Área lesionada
Testemunha	0,00 d	0,00 d
RS2B3R2	8,86 c	126,81 c
RS1B2R2	7,18 c	88,18 c
RS1B3R2	11,86 b	169,93 b
RS1B1d	8,91 c	111,63 c
RS1B2R1	15,77 a	234,04 a
Média Geral	8,76	121,76
CV%	21,86	31,56

\*As médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott-Knott a 5%;

#### 4.4 Atividade antifúngica de óleos essenciais e compostos majoritários sobre os isolados de *Colletotrichum* spp.

Em todos os ensaios *in vitro* foram utilizados 16 isolados, selecionados com base na viabilidade dos mesmos.

##### 4.4.1 Avaliação da eficácia de óleos essenciais de cravo e canela no controle *in vitro* de *Colletotrichum* spp.

Na avaliação da atividade antifúngica dos óleos essenciais de cravo e canela, de acordo com a análise de variância, para a velocidade de crescimento micelial e porcentagem de inibição do patógeno, houve interação significativa entre os isolados, os óleos essenciais e as concentrações testadas (Quadro 13 e Quadro 14).

As concentrações crescentes dos óleos essenciais de cravo e canela afetaram negativamente o desenvolvimento dos isolados de *Colletotrichum* spp. Na velocidade do

crescimento micelial, verificou-se que, para ambos os óleos essenciais, nas concentrações de 250 e 500 ppm, o desenvolvimento do patógeno foi menor ou totalmente inibido, diferindo estatisticamente da testemunha e da concentração de 100 ppm. As testemunhas apresentaram IVCN médio de 4,38 e à medida que as concentrações dos óleos essenciais aumentaram, a velocidade de desenvolvimento dos isolados diminuiu. Para o óleo de cravo, quando comparado com a testemunha, em média, as concentrações de 100, 250 e 500 ppm reduziram o IVCN em 26%, 78% e 98%, respectivamente. Já o óleo de canela, na menor concentração (100 ppm), em média, proporcionou redução de 7,5% no índice de crescimento dos isolados, seguido da concentração de 250 ppm com 66% de inibição e a de 500 ppm com 98%.

O grau de sensibilidade dos isolados foi diferente frente às concentrações e aos tipos de óleos essenciais testados, porém, a maior parte dos isolados mostraram-se mais sensíveis ao óleo essencial de cravo, o qual produziu atividade fungistática, afetando significativamente a velocidade de crescimento do patógeno, principalmente na maior concentração (500 ppm).

Para alguns isolados não houve diferença significativa no índice de velocidade de crescimento quando submetidos ao óleo essencial de cravo ou de canela. Como ocorreu com os isolados de folha SC2F2R2 e de baga RS1B3R2, que não apresentaram diferença significativa no valor de IVCN em todas as concentrações avaliadas. Os isolados RS1B1 e RS1B2R1 foram mais sensíveis ao óleo de canela na concentração de 250 ppm, com total inibição do desenvolvimento fúngico, do que quando submetidos ao óleo de cravo, com valores de IVCN de 1,60 e 1,69. O isolado SC1P5R4, na concentração de 500 ppm, também apresentou maior sensibilidade ao óleo de canela comparado ao óleo de cravo. Entretanto, os isolados PR1P1 e RS1B2R2, em contato com o óleo de canela na concentração de 100 ppm, apresentaram velocidades de crescimento superiores à testemunha. Porém, nas concentrações de 250 e 500 ppm, o desenvolvimento foi menor ou nulo, sendo, portanto, a dose de 500 ppm considerada fungistática.

QUADRO 13. Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) de isolados do fungo *Colletotrichum* spp. sob influência de diferentes concentrações de óleos essenciais de cravo (*Eugenia caryophyllus*) e canela (*Cinnamomum cassia*). Dourados-MS, UFGD, 2022.

Isolado	Óleo essencial de Cravo			
	Concentração (ppm)			
	0	100	250	500
RS1F5R1	4,63 cCa	3,29 bBa	0,00 aAa	0,00 aAa
SC2F2R2	3,52 aBa	3,27 bBa	0,17 aAa	0,33 bAa
SC1F3R2	5,33 eDa	3,32 bCa	2,64 eBa	0,00 aAa
RS1F1R2	5,49 eDa	3,39 bCa	1,07 cBa	0,00 aAa
SC2F3R2	4,92 dDa	2,81 aCa	0,81 bBa	0,00 aAa
SC1F1R4	4,88 dDa	3,59 bCa	1,61 dBa	0,00 aAa
SC1P4R3	4,46 cDa	3,21 bCa	1,07 cBa	0,00 aAa
RS1P2R2	4,94 dCa	3,25 bBa	0,00 aAa	0,00 aAa
PR1P1	4,05 bDa	3,28 bCa	1,23 cBa	0,27 bAa
SC1P4R2	4,54 cCa	3,63 bBa	0,00 aAa	0,00 aAa
SC1P5R4	3,76 bDa	3,11 aCa	1,74 dBa	0,51 bAb
SC2P1R4	4,65 cDa	3,53 bCa	1,47 dBa	0,05 aAa
RS1B2R2	3,21 aBa	2,91 aBa	0,24 aAa	0,33 bAa
RS1B3R2	4,06 bCa	3,35 bBa	0,14 aAa	0,00 aAa
RS1B1	3,58 aDa	3,02 aCa	1,60 dBb	0,00 aAa
RS1B2R1	4,06 bDa	2,93 aCa	1,69 dBb	0,00 aAa

Isolado	Óleo de Canela			
	Concentração (ppm)			
	0	100	250	500
RS1F5R1	4,63 cCa	4,15 cBb	0,09 aAa	0,11 aAa
SC2F2R2	3,52 aBa	3,58 bBa	0,00 aAa	0,00 aAa
SC1F3R2	5,33 eCa	4,94 eCb	3,97 eBb	0,00 aAa
RS1F1R2	5,49 eDa	4,85 eCb	2,70 cBb	0,00 aAa
SC2F3R2	4,92 dDa	3,98 cCb	2,74 cBb	0,00 aAa
SC1F1R4	4,88 dDa	4,47 dCb	3,49 dBb	0,00 aAa
SC1P4R3	4,46 cCa	4,19 cCb	2,77 cBb	0,00 aAa
RS1P2R2	4,94 dCa	4,11 cBb	0,07 aAa	0,00 aAa
PR1P1	4,05 bCa	4,55 dDb	1,99 bBb	0,00 aAa
SC1P4R2	4,54 cBa	4,34 cBb	0,00 aAa	0,00 aAa
SC1P5R4	3,76 bCa	4,11 cCb	2,99 cBb	0,00 aAa
SC2P1R4	4,65 cCa	4,58 dCb	3,28 dBb	0,00 aAa
RS1B2R2	3,21 aBa	3,72 bCb	0,00 aAa	0,00 aAa
RS1B3R2	4,06 bBa	3,73 bBa	0,00 aAa	0,00 aAa
RS1B1	3,58 aCa	2,89 aBa	0,00 aAa	0,00 aAa
RS1B2R1	4,06 bCa	2,61 aBa	0,00 aAa	0,00 aAa

As médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, para cada óleo, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Letras minúsculas iguais em itálico comparam as médias para óleo dentro de cada isolado e concentração.

QUADRO 14. Porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) de isolados do fungo *Colletotrichum* spp. sob influência de diferentes concentrações de óleos essenciais de cravo (*Eugenia caryophyllus*) e canela (*Cinnamomum cassia*). Dourados-MS, UFGD, 2022.

Isolado	Óleo essencial de cravo		
	Concentração (ppm)		
	100	250	500
<b>RS1F5R1</b>	28,31 bBa	100 aAa	100 aAa
<b>SC2F2R2</b>	6,87 dBa	96,13 aAa	90,47 bAb
<b>SC1F3R2</b>	37,18 aCa	47,98 fBa	100 aAa
<b>RS1F1R2</b>	38,89 aCa	77,19 bBa	100 aAa
<b>SC2F3R2</b>	41,59 aCa	82,79 bBa	100 aAa
<b>SC1F1R4</b>	25,67 bCa	62,03 dBa	100 aAa
<b>SC1P4R3</b>	25,57 bCa	72,23 cBa	100 aAa
<b>RS1P2R2</b>	33,87 aBa	100 aAa	100 aAa
<b>PR1P1</b>	15,90 cCa	63,12 dBa	94,23 bAb
<b>SC1P4R2</b>	18,74 cBa	100 aAa	100 aAa
<b>SC1P5R4</b>	15,84 cCa	53,60 eBa	88,49 bAa
<b>SC2P1R4</b>	23,89 bCa	64,65 dBa	99,03 aAa
<b>RS1B2R2</b>	12,59 dBa	91,26 aAb	89,16 bAb
<b>RS1B3R2</b>	19,05 cBa	96,62 aAa	100 aAa
<b>RS1B1</b>	15,90 cCa	43,94 fBb	100 aAa
<b>RS1B2R1</b>	29,75 bCa	52,48 eBb	100 aAa
Isolado	Óleo essencial de canela		
	Concentração (ppm)		
	100	250	500
<b>RS1F5R1</b>	10,86 bBb	98,57 aAa	100 aAa
<b>SC2F2R2</b>	-0,76 dBb	100 aAa	100 aAa
<b>SC1F3R2</b>	5,27 cCb	25,02 dBb	100 aAa
<b>RS1F1R2</b>	12,30 bCb	51,02 bBb	100 aAa
<b>SC2F3R2</b>	15,72 bCb	44,81 bBb	100 aAa
<b>SC1F1R4</b>	7,55 cCb	28,16 dBb	100 aAa
<b>SC1P4R3</b>	0,50 dCb	37,59 cBb	100 aAa
<b>RS1P2R2</b>	13,44 bBb	98,44 aAa	100 aAa
<b>PR1P1</b>	-18,44 fCb	51,24 bBb	100 aAa
<b>SC1P4R2</b>	2,23 dBb	100 aAa	100 aAa
<b>SC1P5R4</b>	-11,51 eDb	23,00 dBb	100 aAa
<b>SC2P1R4</b>	1,48 dCb	32,39 cBb	97,57 aAa
<b>RS1B2R2</b>	-7,24 eCb	100 aAa	100 aAa
<b>RS1B3R2</b>	9,09 cBb	100 aAa	100 aAa
<b>RS1B1</b>	13,22 bBa	100 aAa	100 aAa
<b>RS1B2R1</b>	34,18 aBa	100 aAa	100 aAa

As médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, para cada óleo, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Letras minúsculas iguais em itálico comparam as médias para óleo dentro de cada isolado e concentração.

As maiores porcentagens de inibição fúngica foram observadas nas concentrações de 250 e 500 ppm, tanto para o óleo de cravo quanto para o de canela, as quais diferiram significativamente da testemunha e da concentração de 100 ppm. Os isolados SC2F2R2, PR1P1, RS1B2R2, apresentaram maior sensibilidade ao óleo de canela comparado ao óleo de cravo na concentração de 500 ppm, com inibição de 100% do desenvolvimento.

Existe variabilidade na população do fungo quanto à sensibilidade aos óleos essenciais, contudo, o óleo de cravo promoveu os maiores valores de porcentagem de inibição. Em média a concentração de 100 ppm do óleo de cravo inibiu aproximadamente 24% o crescimento do patógeno, seguida da concentração de 250 ppm com 75% de inibição e o maior valor de PIC foi constatado na concentração de 500 ppm (97%). O óleo essencial de canela em 100 ppm inibiu em média 5% o desenvolvimento dos isolados. Na concentração de 250 ppm a inibição foi de 68% e na de 500 ppm houve 99% de inibição do crescimento micelial, dose que pode ser considerada como fungicida para ambos os óleos.

Em geral, os valores de porcentagem de inibição do crescimento micelial obtidos na concentração mais alta promoveram menor variação na sensibilidade entre os isolados, além de atividade antifúngica satisfatória. Os resultados para PIC corroboram com os resultados encontrados para a IVC, evidenciando que os óleos estudados apresentam fungitoxidade principalmente nas concentrações de 250 e 500 ppm.

O comportamento dos isolados submetidos aos óleos essenciais de cravo e canela e suas diferentes concentrações, evidenciou que ambas as substâncias demonstraram ação fungistática e fungicida, com potencialidades distintas entre os isolados de *Colletotrichum* spp. Um indicativo para as diferenças na sensibilidade é a provável presença de diferentes espécies de *Colletotrichum* no grupo dos isolados avaliados. Esses achados corroboram com Greer et al. (2011), os quais afirmam que as espécies de *Colletotrichum* podem apresentar grandes diferenças na resistência a produtos químicos. De acordo com os autores, a maioria dos isolados de *C. gloeosporioides* são muito sensíveis a fungicidas do grupo químico dos benzimidazóis, enquanto que *C. acutatum* são resistentes aos mesmos. Cao et al. (2017) também verificaram diferenças significativas na sensibilidade dos isolados de *Colletotrichum* de *Hevea brasiliensis*. Segundo os autores, *C. acutatum* mostrou-se mais sensível ao grupo químico dos triazóis do que *C. gloeosporioides*. Esses achados evidenciam a importância de verificar o predomínio geográfico de uma determinada espécie de *Colletotrichum* para o uso correto e eficiente tanto de produtos químicos como alternativos. Souza et al. (2013) explicam

que a análise da estrutura populacional pode fornecer informações úteis sobre o potencial evolutivo de isolados de *Colletotrichum*, bem como auxiliar no desenvolvimento de estratégias de controle desse patógeno, uma vez que os mesmos são versáteis em superar os ingredientes ativos e seus mecanismos de ação.

Gao et al. (2020) relatam que a variação entre isolados da mesma espécie, pode ser explicada pela diferença genética encontrada, permitindo que alguns representantes do grupo aumentem sua resistência sendo mais agressivos durante suas ações fisiológicas e patogênicas.

Neste estudo os óleos essenciais mostraram-se alternativas promissoras no controle de fitopatógenos devido atividade biológica fungicida e fungistática. A atividade fungicida dos óleos essenciais pode ocorrer tanto por ação fungitóxica direta, com efeito cidal; por ação fungistática, inibindo e/ou reduzindo o crescimento micelial e a germinação de esporos; ou pela indução da produção de fitoalexinas e outros compostos de defesa das plantas, atuando como indutores de resistência (OOTANI et al., 2013).

Devido ao grande número de constituintes, os óleos essenciais parecem não ter alvos celulares específicos, portanto, atuam como fungicidas multissítios (MACWAN et al., 2016). Hyldgaard et al. (2012) explicam que a atividade antimicrobiana pode ser regulada por mais de um mecanismo de ação porque os componentes dos óleos essenciais podem apresentar distintos alvos celulares. Os diversos constituintes dos óleos essenciais apresentam diferentes mecanismos de ação e podem atingir vários tipos de patógenos, como bactérias gram-positivas, gram-negativas, leveduras ou fungos, devido a diferença na composição de suas membranas celulares (RAO et al., 2019). Desta forma, pelo fato do seu modo de ação afetar vários alvos ao mesmo tempo, geralmente, nenhuma resistência ou adaptação particular aos óleos essenciais é descrita (BAKKALI et al., 2008). De acordo D'Agostino et al. (2019) existem poucos dados sobre a resistência de fungos a óleos essenciais, a maioria dos estudos diz respeito a bactérias patogênicas.

Dada a possível resistência do patógeno a alguns grupos químicos de fungicidas, os óleos essenciais e seus componentes podem ser uma alternativa para o manejo de *Colletotrichum* spp. em videiras. Embora pouco se saiba sobre os mecanismos de ação dos óleos essenciais e seus compostos, há indicativos de que os efeitos da maioria deles diferem em seus mecanismos de ação, evidenciando que os óleos essenciais podem ser eficientes na prevenção do desenvolvimento de populações resistentes de patógenos (PAVELLA e BENELLI, 2016).

Saad et al. (2013) explicam que devido a complexa composição química dos óleos essenciais, existe a possibilidade de se beneficiar da sinergia entre os componentes e seus diferentes sítios de ação no patógeno. Viegas et al. (2005) verificaram a variabilidade na população de fungos quanto à sensibilidade a óleos essenciais, corroborando com os achados neste estudo. Os autores avaliaram a toxicidade dos óleos de casca de canela (*Cinnamomum zeilanicum* Breym.) e de bulbilho de alho (*Allium sativum* L.) contra 37 isolados do grupo *Aspergillus flavus*. Foi observada resposta diferencial dos isolados quanto à sensibilidade aos dois óleos essenciais testados, porém, em geral, os óleos foram ativos contra todos os isolados do grupo. Segundo Osório et al. (2019), fatores individuais do fungo podem influenciar em sua patogenicidade e resistência antimicrobiana, o que justifica a grande variação entre a sensibilidade microbiana mesmo quando comparada dentro de uma mesma espécie fúngica.

Estudos de diferentes isolados patogênicos de um mesmo gênero são escassos na literatura. Em geral é avaliado o potencial de produtos alternativos com apenas um único isolado ou diferentes patógenos. Essa diferença na sensibilidade pode explicar o porquê uma determinada concentração de óleo essencial inibe um patógeno e uma dose similar não causa o mesmo efeito em outro organismo.

Ramos et al. (2016) avaliaram a atividade antifúngica de treze óleos essenciais e vegetais no controle *in vitro* de *C. gloeosporioides*. O fungo mostrou-se sensível aos óleos essenciais e vegetais, sendo os óleos de cravo e canela fungicidas na concentração mínima de 6,25% (62.500 ppm). Zacaroni et al. (2009) explicam que a atividade antifúngica de um mesmo óleo essencial pode ser observada em diversas populações de patógenos, variando as concentrações que devem ser utilizadas para provocar a inibição dos mesmos. Neste estudo, a ação fungistática e fungicida foi verificada nas concentrações de 250 e 500 ppm (0,025 e 0,05%). Os óleos essenciais têm diferentes valores comerciais e, dependendo de sua atividade, são necessários diferentes volumes para atingir o controle efetivo do fungo. Segundo Marinelli et al. (2012), a viabilidade de uso de um óleo essencial como biofungicida deve considerar o volume utilizado devido ao alto custo. Entretanto, são necessários experimentos para verificar a possível fitotoxicidade em condições de campo.

Os resultados demonstraram que os dois óleos apresentam atividade antifúngica. Tanto o óleo de cravo quanto o de canela foram eficazes na inibição do desenvolvimento dos isolados de *Colletotrichum* spp. na concentração de 500 ppm. A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais é afetada por sua composição e o efeito fungicida

pode ser atribuído aos compostos majoritários presentes, como o eugenol e cinamaldeído, que são os principais componentes desses óleos.

#### 4.4.2 Avaliação da eficácia do óleo essencial de eucalipto no controle *in vitro* de *Colletotrichum* spp.

O efeito inibitório do óleo essencial de eucalipto no desenvolvimento do patógeno foi diferente entre os isolados de *Colletotrichum* spp. e de acordo com as concentrações testadas (Quadro 15). O óleo apresentou maior efeito fungistático na concentração de 2% com menor média de velocidade de crescimento micelial (0,75). Os isolados SC2F2R2, SC1F3R2, RS1F1R2 e SC2P1R4 não diferiram estatisticamente nos valores de IVCm nas concentrações de 1 e 2%. O óleo essencial de eucalipto não interferiu na velocidade de desenvolvimento do isolado RS1B3R2, porém no isolado SC1P4R3 o crescimento do patógeno apresentou maior valor de IVCm (3,29) na concentração de 2%.

QUADRO 15. Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) de isolados do fungo *Colletotrichum* spp. sob influência de diferentes concentrações do óleo essencial de eucalipto (*Eucalyptus globulus*). Dourados-MS, UFGD, 2022.

Isolado	Óleo essencial de Eucalipto		
	Concentração (%)		
	0	1	2
<b>RS1F5R1</b>	5,23 dC	1,64 bB	0,00 aA
<b>SC2F2R2</b>	3,87 bB	0,39 aA	0,08 aA
<b>SC1F3R2</b>	5,33 dB	1,19 bA	0,53 aA
<b>RS1F1R2</b>	5,49 dB	0,49 aA	0,00 aA
<b>SC2F3R2</b>	4,92 dC	2,58 cB	1,51 cA
<b>SC1F1R4</b>	4,88 dC	2,10 cB	0,37 aA
<b>SC1P4R3</b>	4,37 cC	0,80 aA	3,29 eB
<b>RS1P2R2</b>	5,05 dC	1,06 bB	0,00 aA
<b>PR1P1</b>	4,05 cC	2,90 dB	2,02 dA
<b>SC1P4R2</b>	4,57 cC	3,29 dB	0,13 aA
<b>SC1P5R4</b>	4,38 cC	3,18 dB	0,36 aA
<b>SC2P1R4</b>	4,61 cB	1,67 bA	1,13 bA
<b>RS1B2R2</b>	3,10 aB	2,58 cB	0,19 aA
<b>RS1B3R2</b>	3,02 aA	2,45 cA	2,37 dA
<b>RS1B1</b>	2,91 aB	2,50 cB	0,00 aA
<b>RS1B2R1</b>	2,78 aB	2,43 cB	0,00 aA

As médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

O óleo essencial de eucalipto também foi eficaz na inibição do crescimento micelial dos isolados de *Colletotrichum* spp. (Quadro 16). Em média, a inibição foi de aproximadamente 46% e 80% para as concentrações de 1% e 2%, respectivamente. O isolado RS1F1R2 apresentou maior sensibilidade ao óleo essencial de eucalipto, não diferindo estatisticamente no valor de PIC quando submetido nas duas concentrações. Como foi observado para o IVCN, o desenvolvimento do isolado RS1B3R2, foi pouco sensível ao óleo essencial e o SC1P4R3 obteve o menor valor de PIC. Nos isolados RS1F5R1, RS1F1R2, RS1P2R2 e RS1B2R1 o óleo na concentração de 2% apresentou atividade fungicida inibindo em 100% o desenvolvimento do patógeno.

QUADRO 16. Porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) de isolados do fungo *Colletotrichum* spp. sob influência de diferentes concentrações do óleo essencial de eucalipto (*Eucalyptus globulus*). Dourados-MS, UFGD, 2022.

Isolado	Óleo essencial de Eucalipto	
	Concentração (%)	
	1	2
<b>RS1F5R1</b>	51,19 dB	100 aA
<b>SC2F2R2</b>	86,31 aB	97,66 aA
<b>SC1F3R2</b>	76,52 bB	89,64 aA
<b>RS1F1R2</b>	91,28 aA	100 aA
<b>SC2F3R2</b>	44,29 dB	65,33 bA
<b>SC1F1R4</b>	50,68 dB	92,74 aA
<b>SC1P4R3</b>	81,62 aA	22,64 dB
<b>RS1P2R2</b>	72,31 bB	100 aA
<b>PR1P1</b>	22,94 eB	42,26 cA
<b>SC1P4R2</b>	6,71 fB	96,43 aA
<b>SC1P5R4</b>	26,43 eB	92,70 aA
<b>SC2P1R4</b>	62,13 cB	76,44 bA
<b>RS1B2R2</b>	13,80f B	94,71 aA
<b>RS1B3R2</b>	17,23 fA	20,25 dA
<b>RS1B1</b>	13,24 fB	98,91 aA
<b>RS1B2R1</b>	11,55 fB	100 aA

As médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Resultados semelhantes de ação fungicida foram encontrados por Pedrotti et al. (2019), na avaliação do efeito dos óleos essenciais de folhas de duas espécies de *Eucalyptus* (*E. staigeriana* e *E. globulus*) sobre o crescimento micelial de *Botrytis cinerea* e *C. acutatum*. Os compostos majoritários do óleo essencial de *E. staigeriana* foram o citral (30,91%), o 1,8-cineol (24,59%) e limoneno (19,47%). No *E. globulus* o 1,8-cineol

representou 68,26%, o  $\alpha$ -pineno, 16,24%, e  $\alpha$ -terpineol, 6,36%. O óleo essencial de *E. globulus* foi capaz de inibir completamente o crescimento micelial de *B. cinerea* na concentração de 3  $\mu\text{L}/\text{mL}$ . Entretanto, para inibir completamente o crescimento de *C. acutatum*, foi necessária uma concentração de 6  $\mu\text{L}/\text{mL}$ . Os autores explicam que, apesar dos dois óleos essenciais mostrarem atividade antifúngica *in vitro* contra ambos os patógenos, o óleo de *E. staigeriana* apresentou maior atividade de inibição do crescimento micelial e da germinação de conídios em concentrações menores (0,5  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ).

Tomazoni et al. (2017) estudaram a atividade dos óleos essenciais de *Eucalyptus staigeriana*, *Eucalyptus globulus* e *Cinnamomum camphora* contra o fungo *Alternaria solani*. Foram utilizadas as concentrações de 0,1 a 10,0  $\mu\text{L}/\text{mL}$ . Houve diferenças na composição dos óleos essenciais. O *C. camphora* foi caracterizado por linalol (89,9%), óxido de linalol (1,53%) e cânfora (1,28%). Para *E. staigeriana* os compostos majoritários foram o citral (39,68%), o limoneno (16,85%) e acetato de geranila (5,91%). O óleo essencial de *E. globulus* era constituído por 1,8-cineol (69,32%), canfeno (9,41%) seguido de  $\alpha$ -pineno (7,48%) e  $\alpha$ -terpineol (5,08%). Segundo os autores, cada óleo essencial apresentou um comportamento diferente contra os isolados de fungos e isso pode estar relacionado à sua composição. O óleo essencial de *E. staigeriana* teve melhor desempenho devido à sua eficácia em concentrações menores comparado com os outros óleos essenciais analisados.

No presente estudo, os compostos majoritários identificados no óleo essencial de *E. globulus* foram o eucaliptol (57,57%), o-cimeno (19,19%),  $\alpha$ -pineno (7,55%),  $\alpha$ -terpineol (4,64%) e o  $\gamma$ -terpineno (4,02%). Duke e Bogenschutz (2004) afirmam que o eucaliptol é o composto mais importante e característico do gênero *Eucalyptus*, sendo responsável por suas propriedades pesticidas. O óleo de eucalipto é uma mistura complexa de uma variedade de monoterpênos, sesquiterpênos, fenóis aromáticos, óxidos, éteres, álcoois, ésteres, aldeídos e cetonas. No entanto, a composição e proporção exata variam de acordo com a espécie utilizada (BROKER e KLEINIG, 2006). Segundo Batish et al. (2006), a atividade biológica dos óleos de eucalipto decorre de seus componentes como 1,8-cineol, citronelal, citronelol, acetato de citronelil, p-cimeno, eucamalol, limoneno, linalol,  $\alpha$ -pineno,  $\gamma$ -terpineno,  $\alpha$ -terpineol e o-ocimeno. Porém, a bioatividade dos óleos essenciais depende não só dos seus constituintes, mas também da concentração individual dos mesmos, que varia com a espécie, estação do ano, localização, clima, tipo

de solo, idade das folhas, regime de fertilidade, método de secagem do material vegetal e método de extração do óleo (BROKER e KLEINIG 2006).

A variável composição dos óleos essenciais, com diferenças nos seus constituintes e suas concentrações, pode elucidar os diversos indicadores de ações biológicas frente as múltiplas concentrações/doses utilizadas. Saad et al. (2013) explicam que a comparação da bioatividade dos óleos essenciais pode apresentar divergência nos resultados, corroborando os autores anteriormente citados. Além disso, os métodos utilizados para avaliar a atividade antimicrobiana e o patógeno testado, também influenciam nos resultados. Desta forma, há necessidade de padronizar uma metodologia para testar os efeitos antimicrobianos dos óleos essenciais. Assim como realizar estudos *in vivo* para confirmar os resultados *in vitro*. Os ensaios *in vitro* servem para rastrear e orientar os ensaios *in vivo* (VIEIRA et al., 2017).

#### 4.4.3 Avaliação da eficácia dos compostos eugenol e cinamaldeído no controle *in vitro* de *Colletotrichum* spp.

Os compostos eugenol e cinamaldeído demonstraram atividade antifúngica contra os isolados de *Colletotrichum* spp. reduzindo e inibindo o crescimento micelial do patógeno. De acordo com os resultados, para velocidade de crescimento micelial, houve interação significativa entre os isolados, as concentrações e os compostos testados (Quadro 17). Os resultados de porcentagem de inibição não diferiram estatisticamente entre si frente aos ativos eugenol e cinamaldeído (Quadro 18).

O eugenol apresentou maior atividade fungistática quando comparado ao cinamaldeído, corroborando com os resultados dos óleos essenciais de cravo e canela. A sensibilidade dos isolados também foi variável em relação às concentrações e aos dois compostos. Concentrações crescentes de ambos os ativos afetaram o desenvolvimento do patógeno. Nas concentrações de 250 e 500 ppm, para alguns isolados, houve total inibição do crescimento micelial. Em média, a concentração de 100 ppm de eugenol reduziu 40% a velocidade do crescimento fúngico. O composto cinamaldeído, na mesma dose, reduziu 27% demonstrando que, mesmo em baixas concentrações, apresenta ação fungistática. As concentrações de 250 e 500 ppm reduziram a velocidade de crescimento, em média, 76 a 97% para o eugenol e 83 a 98% para cinamaldeído, em comparação a testemunha. Os isolados RS1B2R2 e RS1B3R2, foram mais sensíveis ao cinamaldeído nas concentrações de 250 e 500 ppm, com IVCm menor comparado com a mesma dose de eugenol.

QUADRO 17. Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) de isolados do fungo *Colletotrichum* spp. sob influência de diferentes concentrações de eugenol e cinamaldeído. Dourados-MS, UFGD, 2022.

Isolado	Eugenol			
	Concentração (ppm)			
	0	100	250	500
RS1F5R1	5,08 dDa	2,43 bCa	1,10 bBa	0,13 aAa
SC2F2R2	2,79 aCa	2,75 cCa	1,90 cBb	0,31 bAa
SC1F3R2	4,54 cDa	2,49 bCa	0,68 aBb	0,00 aAa
RS1F1R2	4,49 cDa	1,65 aCa	0,54 aBb	0,00 aAa
SC2F3R2	4,58 cDa	1,67 aCa	0,61 aBb	0,00 aAa
SC1F1R4	4,46 cDa	2,29 bCa	1,08 bBb	0,00 aAa
SC1P4R3	4,54 cCa	2,63 bBa	0,30 aAa	0,00 aAa
RS1P2R2	5,12 dDa	2,46 bCa	1,25 bBb	0,00 aAa
PR1P1	4,76 cDa	2,98 cCa	0,96 bBb	0,00 aAa
SC1P4R2	4,55 cDa	3,15 cCa	0,92 bBa	0,00 aAa
SC1P5R4	4,61 cDa	2,86 cCa	0,86 bBa	0,00 aAa
SC2P1R4	4,04 cDa	2,28 bCa	1,00 bBb	0,00 aAa
RS1B2R2	3,44 bCa	2,60 bBa	2,16 cBb	0,69 bAb
RS1B3R2	3,27 bDa	2,74 cCa	2,13 cBb	0,63 bAb
RS1B1	3,43 bDa	2,64 bCa	1,65 cBb	0,00 aAa
RS1B2R1	2,73 aCa	2,36 bCb	0,87 bBb	0,00 aAa
Isolado	Cinamaldeído			
	Concentração (ppm)			
	0	100	250	500
RS1F5R1	5,08 dDa	3,51 dCb	0,83 cBa	0,00 aAa
SC2F2R2	2,79 aCa	2,47 bCa	0,56 bBa	0,00 aAa
SC1F3R2	4,54 cBa	4,08 eBb	0,00 aAa	0,00 aAa
RS1F1R2	4,49 cCa	3,36 dBb	0,00 aAa	0,00 aAa
SC2F3R2	4,58 cCa	3,19 cBb	0,00 aAa	0,00 aAa
SC1F1R4	4,46 cCa	3,47 dBb	0,00 aAa	0,00 aAa
SC1P4R3	4,54 cDa	2,92 cCa	0,87 cBb	0,00 aAa
RS1P2R2	5,12 dCa	3,01 cBb	0,00 aAa	0,00 aAa
PR1P1	4,76 cCa	3,24 cBa	0,00 aAa	0,00 aAa
SC1P4R2	4,55 cDa	3,07 cCa	0,94 cBa	0,00 aAa
SC1P5R4	4,61 cCa	3,17 cBa	0,42 bAa	0,00 aAa
SC2P1R4	4,04 cCa	3,45 dBb	0,43 bAa	0,00 aAa
RS1B2R2	3,44 bDa	2,88 cCa	0,79 cBa	0,00 aAa
RS1B3R2	3,27 bDa	2,55 bCa	0,76 cBa	0,00 aAa
RS1B1	3,43 bCa	2,60 bBa	0,11 aAa	0,00 aAa
RS1B2R1	2,73 aCa	1,69 aBa	0,41 bAa	0,00 aAa

As médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, para cada óleo, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Letras minúsculas iguais em itálico comparam as médias para óleo dentro de cada isolado e concentração.

QUADRO 18. Porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) de isolados do fungo *Colletotrichum* spp. sob influência de diferentes concentrações de eugenol e cinamaldeído. Dourados-MS, UFGD, 2022.

Isolado	Eugenol		
	Concentração (ppm)		
	100	250	500
RS1F5R1	41,98 aC	78,34 bB	100 aA
SC2F2R2	8,39 bC	52,95 cB	93,16 bA
SC1F3R2	32,78 aB	90,73 aA	100 aA
RS1F1R2	45,21 aB	92,67 aA	100 aA
SC2F3R2	46,82 aB	91,40 aA	100 aA
SC1F1R4	33,21 aC	86,24 aB	100 aA
SC1P4R3	38,57 aC	87,55 aB	100 aA
RS1P2R2	40,02 aC	82,08 bB	100 aA
PR1P1	37,76 aC	88,74 aB	100 aA
SC1P4R2	26,28 bC	80,54 bB	100 aA
SC1P5R4	34,52 aC	86,32 aB	100 aA
SC2P1R4	37,05 aC	77,26 bB	100 aA
RS1B2R2	17,13 bC	47,69 cB	87,97 bA
RS1B3R2	15,43 bC	47,42 cB	88,59 bA
RS1B1	16,65 bC	60,16 cB	100 aA
RS1B2R1	19,80 bC	74,07 bB	100 aA
Isolado	Cinamaldeído		
	Concentração (ppm)		
	100	250	500
RS1F5R1	36,35 aC	83,11 aB	100 aA
SC2F2R2	10,28 cC	67,03 cB	100 aA
SC1F3R2	21,73 bB	94,78 aA	100 aA
RS1F1R2	35,05 aB	95,15 aA	100 aA
SC2F3R2	37,81 aB	94,75 aA	100 aA
SC1F1R4	26,92 bB	90,25 aA	100 aA
SC1P4R3	36,54 aC	84,03 aB	100 aA
RS1P2R2	40,46 aB	90,53 aA	98,78 aA
PR1P1	35,05 aB	91,25 aA	100 aA
SC1P4R2	23,43 bC	80,03 bB	100 aA
SC1P5R4	32,85 aC	87,55 aB	100 aA
SC2P1R4	25,65 bC	84,84 aB	100 aA
RS1B2R2	12,95 cC	66,25 cB	89,21 aA
RS1B3R2	16,91 cC	64,64 cB	91,86 aA
RS1B1	17,30 cC	76,54 bB	100 aA
RS1B2R1	21,85 bC	77,65 bB	100 aA

As médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, para cada óleo, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Amiri et al. (2008) avaliaram a atividade *in vitro* do eugenol contra quatro patógenos de frutos de maçã nos volumes de 50, 100 e 150  $\mu\text{L/L}$  (50, 100 e 150 ppm). As concentrações de 100 e 150  $\mu\text{L/L}$  inibiram completamente o crescimento micelial dos fungos e o tratamento com 50  $\mu\text{L}$  resultou em taxas de inibição que variaram entre 72 e 86%, corroborando com os achados neste estudo, indicando que o eugenol, mesmo em concentrações baixas, apresenta propriedades fungistáticas.

O cinamaldeído também inibiu o crescimento micelial dos isolados de *Colletotrichum* spp. na concentração de 100 ppm. Wu et al. (2017) relatam atividade antifúngica pronunciada do mesmo composto, na concentração de 0,50 mL/L (500 ppm), contra *Geotrichum citri-aurantii*, doença fúngica de pós-colheita em *citrus*. Gan et al. (2020) também relatam que o cinamaldeído na dose de 8 mg/mL possui ação antifúngica contra *Penicillium digitatum*, causando redução no crescimento micelial e na germinação dos esporos.

O eugenol é um composto lipofílico que pode se dispersar facilmente entre as cadeias que compõem as bicamadas lipídicas das membranas celulares. Desta forma, ele é capaz de modificar a fluidez e a permeabilidade das mesmas, perturbando assim o crescimento celular (PINA-VAZ et al., 2004). Wang et al. (2010) explicam que a atividade antifúngica do eugenol tem sido atribuída ao rompimento da estrutura da membrana fúngica, principalmente pelo acúmulo desse composto na bicamada fosfolipídica. Essa interação altera a fluidez e a permeabilidade das membranas, além de afetar a função de enzimas ou proteínas ligadas à membrana.

Para Freisesleben e Jager (2014), os agentes antifúngicos dos óleos essenciais podem causar a morte do patógeno perturbando a estrutura e função das membranas ou organelas da célula fúngica, inibindo o material nuclear e a síntese proteica. Estudos relatam que a natureza citotóxica dos óleos essenciais e seus constituintes se deve a capacidade de romper a parede e a membrana celular, coagular o citoplasma e, portanto, danificar organelas celulares e provocar extravasamento de macromoléculas (BURT, 2004). Dwivedy et al. (2016) explicam que a natureza lipofílica dos óleos permite que eles passem através da parede celular e causem danos à membrana citoplasmática, rompendo camadas de polissacarídeos, ácidos graxos e fosfolipídios.

Basak e Guha (2018) ressaltam que um importante local de ação dos óleos essenciais e seus compostos é a membrana celular, e que muitos constituintes atuam interferindo na estabilidade e funcionamento da mesma. Os compostos antimicrobianos interagem com a membrana podendo afetar o transporte de nutrientes e íons, seu potencial

elétrico e a sua permeabilidade. Esses efeitos são investigados medindo o fluxo de íons intracelulares como  $K^+$  e  $H^+$ , que podem ser alterados, modificando o pH celular e afetando a composição química das células e sua atividade (LAMBERT et al., 2001). A perda de permeabilidade da membrana resulta em um desequilíbrio na pressão osmótica intracelular, o que desencadeia quebra da homeostase celular com consequente destruição e morte da mesma (BASAK e GUHA, 2018).

De acordo com Oliveira et al. (2013), o eugenol exerce atividade antifúngica na parede e membrana celular, interrompendo a biossíntese de ergosterol. O menor teor de ergosterol interfere na integridade e funcionalidade da membrana celular. O ergosterol possui papel fundamental na regulação da fluidez, permeabilidade, estabilidade térmica e sobre a atividade e estrutura de proteínas integrais da membrana (DUPONT et al., 2012). A sua presença na membrana e a integridade de sua rota biossintética são essenciais para o crescimento celular fúngico (ALCAZAR-FUOLI et al., 2008).

Desta forma, podemos inferir que o eugenol apresenta atividade semelhante aos triazóis, os quais inibem o crescimento celular através da interrupção da biossíntese do ergosterol, por meio da ligação dos antifúngicos ao ergosterol na membrana celular. Assim, esse processo afeta a integridade e a função de algumas das proteínas ligadas à membrana levando a distúrbios osmóticos, interrupção do crescimento e proliferação celular (BENDAHA et al., 2011).

Sobre as ações do cinamaldeído, há relatos na literatura que o mesmo exerce atividades antifúngicas inibindo a biossíntese da parede celular, destruindo a integridade da membrana plasmática e alterando as atividades enzimáticas específicas (SHREAZ et al. 2016). Wei et al. (2020) avaliaram o efeito antifúngico do cinamaldeído contra *Fusarium sambucinum*, e, segundo os autores, a membrana celular pode ser o primeiro e principal local de ação do composto. Os resultados sugerem que o cinamaldeído exerce atividade antifúngica, afetando os processos biossintéticos do ergosterol, o que leva à ruptura da integridade da membrana celular. Ouyang et al. (2019), na determinação do mecanismo antifúngico do cinamaldeído contra *G. citri-aurantii*, relatam que o tratamento com o composto ocasionou mudanças morfológicas nas paredes e membranas celulares do patógeno, indicando que o seu principal mecanismo antifúngico é atribuído ao comprometimento na formação da parede celular e o rompimento da integridade da mesma.

De acordo com Lopes et al. (2013), a membrana celular dos fungos desempenha um papel fundamental na estrutura fúngica e na função fisiológica, por isso são alvos

antifúngicos importantes. No presente estudo, tanto o eugenol quanto o cinamaldeído interromperam o crescimento micelial do patógeno. Para o fungo, a produção de hifas é importante na colonização do hospedeiro, que se dá através do crescimento ativo do seu micélio. A indução de anormalidades morfológicas causadas por esses compostos, são importantes na prevenção do crescimento, viabilidade e agressividade do patógeno.

Fazendo uma análise em relação ao exposto, a ação dos fungicidas sintéticos é conhecida, estudada e relatada. Já os sítios de ação dos óleos essenciais ainda não foram totalmente esclarecidos, porém, independente do mecanismo ou modo de ação, os efeitos fungicidas dos óleos essenciais e seus compostos majoritários mostram seu potencial para uso no controle de fitopatógenos.

Em termos de propriedades fungistáticas e fungicidas, o eugenol e o cinamaldeído apresentaram alta atividade antifúngica contra *Colletotrichum* spp. *in vitro*, tornando estes dois compostos naturais, candidatos para o controle deste patógeno, porém estudos *in vivo* são necessários para confirmar esses resultados.

#### 4.4.4 Avaliação da eficácia do composto eucaliptol no controle *in vitro* de *Colletotrichum* spp.

O composto eucaliptol apresentou ação fungistática e fungicida nos isolados de *Colletotrichum* spp. De acordo com os resultados, houve interação significativa entre os isolados e as concentrações testadas para o IVCN e PIC (Quadro 19 e Quadro 20).

No tratamento controle, a velocidade de crescimento diário do fungo foi em média de 2,45. A aplicação do composto eucaliptol reduziu significativamente o crescimento dos isolados de *Colletotrichum* spp. Na concentração de 1% o valor de IVCN reduziu para 0,41 e em 2% o resultado obtido foi 0,11. Somente nos isolados SC1F3R2, RS1P2R2, PR1P1 e RS1B1, houve diferença significativa entre as duas concentrações testadas. Os isolados apresentaram sensibilidades diferenciadas frente a concentração de 1% de eucaliptol. Entretanto, a variação de IVCN foi menor na concentração de 2%, sugerindo atividade fungistática entre os isolados.

A atividade antifúngica do eucaliptol (96%) foi constatada na concentração de 2%. Para onze isolados não houve diferença significativa nos valores de PIC entre as duas concentrações testadas.

Os óleos essenciais de eucalipto e seus principais constituintes produzem toxicidade contra bactérias e fungos, tanto patógenos de solo quanto pós-colheita. Estudos indicam que os mesmos agem reduzindo o crescimento micelial e inibindo a produção e germinação de esporos. No entanto, a sua bioatividade depende do tipo de constituintes e sua concentração individual (BATISH et al., 2008).

QUADRO 19. Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) de isolados do fungo *Colletotrichum* spp. sob influência de diferentes concentrações de eucaliptol. Dourados-MS, UFGD, 2022.

Isolado	Eucaliptol		
	Concentração (%)		
	0	1	2
<b>RS1F5R1</b>	2,75 bB	0,00 aA	0,00 aA
<b>SC2F2R2</b>	2,18 aB	0,18 aA	0,00 aA
<b>SC1F3R2</b>	2,70 bC	1,46 bB	0,23 aA
<b>RS1F1R2</b>	2,63 bB	0,30 aA	0,00 aA
<b>SC2F3R2</b>	2,55 bB	0,23 aA	0,00 aA
<b>SC1F1R4</b>	2,80 bB	0,00 aA	0,00 aA
<b>SC1P4R3</b>	2,50 bB	0,00 aA	0,00 aA
<b>RS1P2R2</b>	2,79 bC	1,13 bB	0,21 aA
<b>PR1P1</b>	2,77 bC	0,80 bB	0,00 aA
<b>SC1P4R2</b>	2,58 bB	0,82 bA	1,08 bA
<b>SC1P5R4</b>	2,63 bB	0,00 aA	0,00 aA
<b>SC2P1R4</b>	2,59 bB	0,00 aA	0,00 aA
<b>RS1B2R2</b>	1,98 aB	0,31aA	0,00 aA
<b>RS1B3R2</b>	1,93 aB	0,00 aA	0,27 aA
<b>RS1B1</b>	1,87 aB	1,33 bB	0,00 aA
<b>RS1B2R1</b>	1,90 aB	0,00 aA	0,00 aA

As médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

QUADRO 20. Porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) de isolados do fungo *Colletotrichum* spp. sob influência de diferentes concentrações de eucaliptol. Dourados-MS, UFGD, 2022.

Isolado	Eucaliptol	
	Concentração (%)	
	1	2
<b>RS1F5R1</b>	100 aA	100 aA
<b>SC2F2R2</b>	93,69 aA	100 aA
<b>SC1F3R2</b>	58,22 cB	94,46 aA
<b>RS1F1R2</b>	91,65 aA	100 aA
<b>SC2F3R2</b>	94,27 aA	100 aA
<b>SC1F1R4</b>	100 aA	100 aA
<b>SC1P4R3</b>	100 aA	100 aA
<b>RS1P2R2</b>	73,29 bB	95,15 aA
<b>PR1P1</b>	75,78 bB	100 aA
<b>SC1P4R2</b>	72,29 bA	69,48 bA
<b>SC1P5R4</b>	100 aA	100 aA
<b>SC2P1R4</b>	100 aA	96,93 aA
<b>RS1B2R2</b>	89,32 aB	100 aA
<b>RS1B3R2</b>	100 aA	91,12 aA
<b>RS1B1</b>	41,06 dB	100 aA
<b>RS1B2R1</b>	100 aA	100 aA

As médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Em geral, os óleos essenciais integrais exibem maior atividade biológica do que quando seus componentes principais são separados. Tal fato sugere que os constituintes secundários dos óleos essenciais podem ser críticos para a atividade antimicrobiana devido ao efeito sinérgico dos seus componentes (RAO et al., 2019). No presente estudo, tanto os óleos essenciais quanto os seus compostos majoritários isolados apresentaram atividades antifúngicas contra *Colletotrichum* spp., com porcentagens semelhantes de inibição e redução no desenvolvimento do patógeno. Porém, quando analisados comparativamente, nos óleos essenciais integrais, o composto majoritário encontra-se em menor concentração (eugenol: 87,7%; eucaliptol: 57,57%; cinamaldeído entre 60-75%), assim, para o componente majoritário de forma isolada atingir efeito similar ao do óleo essencial integral, foi necessária que a sua concentração fosse relativamente maior (95%).

Considerando os resultados discutidos acima, os efeitos de atividade antifúngica dos óleos essenciais de cravo, canela e eucalipto, provavelmente decorrem de ação

sinérgica entre os compostos majoritários e os demais componentes identificados pelas análises cromatográficas.

Estudos vêm sendo realizados para demonstrar o sinergismo entre diferentes óleos essenciais e seus compostos, a combinação de alguns óleos específicos resultou em ações combinadas de dois ou mais constituintes. Essa atividade combinatória é vista como vantajosa para estudos de proteção de doenças de pré e pós-colheita, uma vez que os patógenos tendem a ter maiores dificuldades em adquirir resistência a um constituinte específico (CHOUHAN et al., 2017). Delaquis et al. (2002) explicam que o uso de combinações de diferentes óleos essenciais ou constituintes químicos fracionados pode produzir quatro possíveis efeitos antimicrobianos, entre eles: sinérgico, aditivo, indiferente ou antagonista a múltiplos componentes.

Saracino et al. (2022) testaram a atividade antifúngica e o efeito sinérgico de cinco componentes puros de óleos essenciais (cinamaldeído,  $\alpha$ -pineno, limoneno, eucaliptol e eugenol) contra 18 cepas de *Candida*. O cinamaldeído e o eugenol apresentaram os melhores resultados, inibindo todas as cepas. Segundo os autores, a combinação dos dois compostos produziu rápida perda de células viáveis e suas propriedades antimicóticas foram expressas em concentrações mais baixas comparadas ao óleo essencial.

A identificação dos componentes ativos dos óleos essenciais é fundamental, bem como o entendimento do mecanismo de ação. Isso permite selecionar as melhores e adequadas condições de cultivo, colheita e extração do óleo da planta ou partes da planta, para obter a composição ideal e mais ativa de um óleo essencial. Além disso, uma vez conhecidos os componentes ativos, é possível desenvolver e preparar análogos sintéticos, os quais apresentam maior viabilidade econômica e controle em termos de reprodutibilidade (SAAD et al., 2013; DAMMAK et al. 2019; ROZWALKA et al., 2020).

As diferentes eficácias entre os tratamentos se devem ao fato de que a atividade antifúngica dos óleos essenciais depende das propriedades fungitóxicas dos componentes ativos mais significativos e de sua sinergia (LOPEZ-REYES et al. 2010).

A maioria dos estudos publicados sobre o controle de fitopatógenos mostra apenas a atividade antifúngica dos óleos essenciais e não descreve e testa suas composições químicas. Portanto, o conhecimento da composição e dos possíveis compostos inibidores fúngicos pode auxiliar no controle de doenças. Para tanto, podem ser utilizados um ou vários compostos para inibir o patógeno isoladamente ou por sinergismo (ROZWALKA et al., 2020).

As doenças causadas por fungos fitopatogênicos são de grande importância para a agricultura, e o desenvolvimento de novos produtos para o controle de fitopatógenos são necessários. Os óleos essenciais derivados de plantas são promissores agentes antifúngicos naturais, geralmente não fitotóxicos e de baixo impacto ambiental (FENG e ZHENG, 2007).

O avanço das técnicas alternativas e a busca por novas moléculas têm o objetivo de contribuir para uma agricultura adequada às novas demandas de qualidade ambiental e de vida da sociedade atual. O processo de pesquisa, desenvolvimento e registro, até a introdução de um novo defensivo agrícola no mercado é complexo, de custo elevado e longo, pois os novos produtos precisam ser, além de eficazes, seguros para o homem e para o meio ambiente (NANUCI, 2019).

Pesquisas na área de plantas medicinais como defensivos naturais são promissoras, com possibilidade de novas e relevantes descobertas. Assim, os vegetais são fonte inesgotável de moléculas que podem servir de modelo para síntese química, gerando produtos de baixo custo, eficazes, ambientalmente seguros, padronizados, registrados, com controle de qualidade visando à reprodutibilidade e constância de componentes químicos (MORAIS, 2009).

Dificuldades para preparar formulações apropriadas, diferenças na composição química de plantas de uma mesma espécie devido a fatores intrínsecos e extrínsecos e informações esparsas sobre os princípios ativos, são entraves que precisam ser solucionados visando o desenvolvimento deste campo de pesquisa. Outro entrave a ser observado no uso de moléculas bioativas alternativas é a dificuldade de produção da matéria-prima em escala industrial a custos competitivos comparados aos produtos sintéticos comerciais (BORGES et al., 2011).

Assim, os resultados do presente estudo sugerem que os óleos essenciais de cravo, canela e eucalipto e seus compostos majoritários (eugenol, cinamaldeído e eucaliptol) podem ser explorados no desenvolvimento de novos produtos para o controle da antracnose e da podridão da uva madura no campo. No entanto, experimentos para avaliar a fitotoxicidade são necessários, pois embasam os processos de desenvolvimento de novos produtos, visto que antecipam riscos e, portanto, reduzem os efeitos adversos e deletérios a planta.

## 5 CONCLUSÕES

Os padrões de caracterização cultural e morfológica dos isolados fúngicos obtidos de tecidos vegetais (folhas, pecíolos e bagas) de videiras da variedade Niágara Rosada, provenientes de diferentes origens geográficas (MS, PR, RS, SC), sugerem que, os mesmos pertencem aos complexos de *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* e *Elsinoe ampelina*.

Não houve relação de caracterização morfológica, local de origem e órgão de isolamento entre os grupos quanto a agressividade.

Os óleos essenciais de cravo, canela e eucalipto e seus compostos majoritários (eugenol, cinamaldeído e eucaliptol) foram eficazes no controle *in vitro* de *Colletotrichum* spp., exercendo efeito fungistático e fungicida.

Cada óleo essencial e seu composto apresentou um comportamento diferente frente aos isolados, observando variabilidade do fungo em relação a sensibilidade a seus compostos.

## REFERÊNCIAS

- AFFONSO, R.S. et al. Aspectos químicos e biológicos do óleo essencial de cravo da Índia. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 2, p. 146-161, 2012.
- AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. 5. ed. California: Elsevier Academic Press, 2005. 948p.
- ALCAZAR-FUOLI, L. et al. Ergosterol biosynthesis pathway in *Aspergillus fumigatus*. **Steroids**, v. 73, n. 3, p. 339-347, 2008.
- ALMA, M. H. et al. Chemical composition and content of essential oil from the bud of cultivated Turkish clove (*Syzygium aromaticum* L.). **BioResources**, v. 2, n. 2, p. 265-269, 2007.
- ALMEIDA, C.C. R. de; CORRÊA, V. S.; SOARES, S. da S. Evolução tecnológica no setor vitivinícola: vínculos com a Embrapa uva e vinho. **Revista de Estudos Sociais**, v. 19, n. 38, p. 1-23, 2017.
- AMADIOHA, A. C. Controlling rice blast *in vitro* and *in vivo* with extracts of *Azadirachia indica*. **Crop Protection**, v.19, p. 287-90, 2000.
- AMIRI, A. et al. *In vitro* and *in vivo* activity of eugenol oil (*Eugenia caryophyllata*) against four important postharvest apple pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, v. 126, n. 1-2, p. 13-19, 2008.
- ANDRADE, E. M. et al. Caracterização morfo-cultural e molecular de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* patogênicos ao mamoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, n. 1, p. 21-31, 2007.
- ANDREI, P. et al. **Aromaterapia e suas aplicações**. Cadernos. Centro Universitário S. Camilo: São Paulo, v. 11, n. 4, p. 57-68, 2005.
- ANDRIGUETO, J.R. et al. **Marco legal da produção integrada de frutas do Brasil**. Brasília, Brasil: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2002. Disponível em: <file:///C:/Users/Suellen/Downloads/livro-pif-sap 13maio08revisado\_0%20(2).pdf>. Acesso em: 4 mar. 2021.
- BAILEY, J.A.; JEGER, J.M. **Colletotrichum: Biology, Pathology and Control**. Oxford: British Society for Plant Pathology, 1992. 388p.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils- A review. **Food and Chemical Toxicology**, n.46, v.2, p.446-475, 2008.
- BARROS, L. et al. Incidence of grape anthracnose on different *Vitis labrusca* and hybrid cultivars and rootstocks combination under humid subtropical climate. **Australasian Plant Pathology**, v.44, n.4, p.397-403, 2015.

BASAK, S.; GUHA, P. A review on antifungal activity and mode of action of essential oils and their delivery as nano-sized oil droplets in food system. **Journal of Food Science and Technology**, v.55, n.12, p.4701-4710, 2018.

BATISH, D. R. et al. Chemical composition and phytotoxicity of volatile essential oil from intact and fallen leaves of *Eucalyptus citriodora*. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 61, n. 7-8, p. 465-471, 2006.

BATISH, D. R. et al. Eucalyptus essential oil as a natural pesticide. **Forest ecology and management**, v. 256, n. 12, p. 2166-2174, 2008.

BENDAHA, H. et al. New azole antifungal agents with new modes of action: synthesis and biological studies of new tridentated ligands based on pyrazole and triazole. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.46, p. 4117- 4124, 2011.

BONETT, L. P. et al. Caracterização morfo-cultural e infecção cruzada de *Colletotrichum gloeosporioides* agente causal da antracnose de frutos e hortaliças em pós-colheita. **Ambiência**, v. 6, n. 3, p. 451-463, 2010.

BORGES, L.M.F. et al. Perspectives for the use of plant extracts to control the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Revista Brasileira Parasitologia e Veterinária**, v. 20, p. 89-96, 2011.

BRAGA, Z. et al. Histopathology of infection and colonisation of *Elsinoë ampelina* on grapevine leaves. **European Journal of Plant Pathology**, v.154, n.4, p.1009-1019, 2019.

BROKER, M. I. H.; KLEINIG, D. A. Field Guide to Eucalyptus vol. 1 South-eastern Australia. 2006.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 223-253, 2004.

CABALLERO, B. et al. **Encyclopedia of food sciences and nutrition**. 2. ed. Amsterdam: Academic Press, 2003.

CAMARGO, E. A. et al. Progressos na viticultura brasileira. **Revista Brasileira Fruticultura**, v. esp., p.144-149, 2011.

CAMPBELL, C. L. et al. **Introduction to plant disease epidemiology**. John Wiley & Sons. 1990.

CANNON, P. F. et al. *Colletotrichum* – current status and future directions. **Studies in mycology**, v. 59, n. 1, p. 129-145, 2012.

CAO, X. et al. Distribution and fungicide sensitivity of *Colletotrichum* species complexes from rubber tree in Hainan, China. **Plant Disease**, v. 101, n. 10, p. 1774-1780, 2017.

CARVALHO, M. C. et al. Impactos das mudanças climáticas sobre a distribuição espacial da podridão da uva madura em videira. In: **Embrapa Meio Ambiente-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: CONGRESSO INTERINSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO

CIENTÍFICA, 5., 2011, Campinas. Anais... Campinas: Embrapa Monitoramento por Satélite, 2011. 1 CD ROM., 2011.

CAVALCANTI, F. R.; GARRIDO, L. da R. **Controle de doenças**. In: GARRIDO, L. da R.; HOFFMANN, A.; SILVEIRA, S. V. da. Produção integrada de uva para processamento: manejo de pragas e doenças. Brasília, DF: Embrapa, v. 4, 2015.

CHOUHAN, S. et al. Antimicrobial Activity of Some Essential Oils—Present Status and Future Perspectives. **Pest Management Science**, v. 66, n. 11, p. 1268-1272, 2017.

CHOWDAPPA, P. et al. Caracterização morfológica e molecular de espécies de *Colletotrichum* causando antracnose de videira na Índia. **The Asian and Australasian Journal of Plant Science and Biotechnology**, v.3, n.1, p.71-77, 2009.

CORTÉS-ROJAS, D. F. et al. Clove (*Syzygium aromaticum*): a precious spice. **Asian Pacific journal of tropical biomedicine**, v. 4, n. 2, p. 90-96, 2014.

COSTA, A. R. T. et al. Ação do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & LM Perry sobre as hifas de alguns fungos fitopatogênicos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, p. 240-245, 2011.

D'AGOSTINO, M. et al. Essential oils and their natural active compounds presenting antifungal properties. **Molecules**, v. 24, n. 20, p. 3713, 2019.

DA CUNHA LIMA, J. A. et al. O estado da técnica do eugenol: uma prospecção tecnológica fundamentada em base de dados de patentes e periódicos. **Revista Virtual de Química**, v. 11, n. 3, 2019.

DA GRAÇA CARDOSO, M. et al. Avaliação do potencial fungitóxico do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr & Perry (cravo-da-índia). **Tecno-Lógica**, v. 11, p. 11-14, 2007.

DA SILVA, R. T. et al. Propriedades biológicas da levana de *Bacillus subtilis* e do óleo essencial de canela para aplicação em formulações cosmeceúticas. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 5, p. 23009-23024, 2020.

DAFERERA; D.J.et al. Analysis of essential oils from some greek aromatic plants and their fungitoxicity in *Penicillium digitatum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, n. 6, p. 2576–2581, 2000.

DAMM, U. et al. The *Colletotrichum acutatum* species complex. **Studies in mycology**, v. 73, p. 37-113, 2012.

DAMMAK, I. et al. Evaluation of antifungal and anti-ochratoxigenic activities of *Salvia officinalis*, *Lavandula dentata* and *Laurus nobilis* essential oils and a major monoterpene constituent 1, 8-cineole against *Aspergillus carbonarius*. **Industrial Crops and Products**, v. 128, p. 85-93, 2019.

DE CARVALHO, C. F. R. et al. Compostos bioativos e o controle de carrapatos em bovinos. **Pubvet**, v. 9, p. 287-347, 2015.

DE MORAIS, L. A. S. **Óleos essenciais no controle fitossanitário**. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Org.). Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, p. 139- 151, 2009.

DELAQUIS, P.J. et al. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. **International Journal of Food Microbiology**, v.74, p.101-109, 2002.

DOS SANTOS, R. F. et al. Temporal and spatial dynamics of grapevine anthracnose and its relationship to pathogen survival. **Journal of Phytopathology**, v. 168, n. 7, p. 380-390, 2020.

DOWLING, M. et al. Managing *Colletotrichum* on fruit crops: A “complex” challenge. **Plant Disease**, v. 104, n. 9, p. 2301-2316, 2020.

DUKE, J.; BOGENSCHUTZ, M.J. **Dr. Duke's phytochemical and ethnobotanical databases**. USDA, Agricultural Research Service, 2004.

DUPONT, S. et al. Ergosterol biosynthesis: a fungal pathway for life on land? **Evolution**, v. 66, n. 9, p. 2961-2968, 2012.

DWIVEDY, A.K. et al. Planting essential oils against food-borne fungi and mycotoxins. **Current Opinion in Food Science**, v. 11, p. 16-21, 2016.

ECHEVERRIGARAY, S. et al. *Colletotrichum* species associated to ripe rot disease of grapes in the “Serra Gaucha” region of Southern Brazil. In: **BIO Web of Conferences**. EDP Sciences, p. 01008, 2019.

ECHEVERRIGARAY, S. et al. *Colletotrichum* species causing grape ripe rot disease in *Vitis labrusca* and *V. vinifera* varieties in the highlands of southern Brazil. **Plant Pathology**, v. 69, n. 8, p. 1504-1512, 2020.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Embrapa Uva e Vinho: Cultivares de uva, 2022. Disponível em: < <https://www.embrapa.br/en/uva-e-vinho/programa-uvas-do-brasil>>. Acesso em: 5 ago. 2022.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Inteligência e Mercado de Uva e Vinho, 2021. Disponível em: < <https://www.embrapa.br/en/cim-uva-e-vinho/a-viticultura-no-brasil#:~:text=A%20viticultura%2C%20no%20Brasil%2C%20ocupa,11%2015%20S.>>. Acesso em: 04 fev. 2021.

FENG, W.; ZHENG, X. Essential oils to control *Alternaria alternata* *in vitro* and *in vivo*. **Food control**, v. 18, n. 9, p. 1126-1130, 2007.

FERRANTI, T. H. **Caracterização de compostos fenólicos de sucos de *Vitis labrusca* variedade Bordô sob diferentes sistemas de manejo agrícola**. 2017. 46 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Gestão Vitivinícola) - Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul-RS.

FERREIRA, D. F. Programa SISVAR: **Sistema de Análise de Variância**. Versão 5.6. Lavras: DEX/UFLA. 2003.

FRAC. **Classification of Fungicides**. Fungal control agents by cross resistance pattern and mode of action, 2020.

FREISESLEBEN, S. H; JAGER, A. K. Correlation between plant secondary metabolites and their antifungal mechanisms—a review. **Medicinal Aromatic Plants**. v.3, p.1-6, 2014.

FURUYA, S. et al. Monitoring of QoI fungicide resistance in *Plasmopara viticola* populations in Japan. **Pest Management Science**, v.66, n. 11, p 1268-1272, 2010.

GAN, Z. et al. Synthesis and antifungal activities of cinnamaldehyde derivatives against *Penicillium digitatum* causing citrus green mold. **Journal of Food Quality**, v. 2020, 2020.

GAO, M. et al. Molecular and physiological characterization of *Arabidopsis-Colletotrichum gloeosporioides* pathosystem. **Plant Pathology**, v. 70, n. 1, p. 1168-1179, 2020.

GARRIDO, L. da R. et al. Principais doenças fúngicas da videira no Sul do Brasil. **Circular técnica**. Embrapa: Embrapa Uva e Vinho, n.56, p. 1-32, 2005.

GARRIDO, L. da R.; BOTTON, M. Recomendações técnicas para evitar resistência de patógenos, insetos e ácaros-pragas a fungicidas e inseticidas na cultura da videira: conceitos, fatores envolvidos e práticas gerais para o manejo. **Comunicado técnico**. Embrapa: Embrapa uva e vinho, n. 220, p. 1-13, 2021.

GARRIDO, L. da R.; GAVA, R. **Manual de doenças fúngicas da videira**. Embrapa Uva e Vinho-Livro técnico (INFOTECA-E), 2014.

GARRIDO, L. da R.; SÔNEGO, O. R. Podridão da uva madura ou podridão de *Glomerella*: biologia, epidemiologia e controle. **Circular técnica**. Embrapa: Embrapa Uva e Vinho, n. 52, p. 1-10, 2004.

GODOY, C. V. et al. Eficiência de fungicidas multissítios no controle da ferrugem-asiática da soja, *Phakopsora pachyrhizi*, na safra 2017/18: resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. **Circular Técnica**. Embrapa: Embrapa Soja, n. 144, p. 1-17, 2018.

GREER, L. A. et al. Ripe rot of south-eastern Australian wine grapes is caused by two species of *Colletotrichum*: *C. acutatum* and *C. gloeosporioides* with differences in infection and fungicide sensitivity. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 17, n. 2, p. 123-128, 2011.

HORA, G.B. DA. et al. **Inovação na indústria vitivinícola do Vale do submédio São Francisco**. 1. ed. Aracaju: IFS, 2016. 86 p.

HYLDGAARD, M. et al. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Frontiers In Microbiology**, v. 3, n.25, 2012.

JAKHETIA, V. et al. *Cinnamon: a pharmacological review*. **Journal of Advanced Scientific Research**, v. 1, n. 2, p. 19-23, 2010.

JOSHI, R. K. Chemical disparity in the oil from leaves of *Cinnamomum zeylanicum* Blume. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 34, n. 6, p. 443-449, 2019.

JULIATTI, C. et al. Desenvolvimento e uso de fungicidas para o controle de doenças de plantas na primeira década do século XXI. **RAPP**, v.19, p. 1-69, 2011.

KAMATOU, G. P. et al. Eugenol—from the remote Maluku Islands to the international market place: a review of a remarkable and versatile molecule. **Molecules**, v. 17, n. 6, p. 6953-6981, 2012.

KASSAHUN, A.; FELEKE, G. Chemical composition and physico-chemical analysis of *Eucalyptus globulus* leave and oil. **Science Journal of Chemistry**, v. 7, n. 2, p. 36-38, 2019.

KHALIL, A. A. et al. Essential oil eugenol: sources, extraction techniques and nutraceutical perspectives. **RSC advances**, v. 7, n. 52, p. 32669-32681, 2017.

KNAAK, N.; FIUZA, L. M. Potential of essential plant oils to control insects and microorganisms. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 5, n. 2, p. 120-132, 2010.

KOWAL, A. N. et al. Principais entraves para o cultivo da videira identificados pelos produtores rurais na região do Planalto Norte Catarinense. **FRUSUL-Simpósio de Fruticultura da Região Sul**, v. 3, n. 1, 2022.

LAMBERT, R.J.W. et al. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, v.91, n.3, p. 453-462, 2001.

LANA, E. J. L. et al. Synthesis of 1, 8-cineole and 1, 4-cineole by isomerization of  $\alpha$ -terpineol catalyzed by heteropoly acid. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 259, n. 1-2, p. 99-102, 2006.

LI, Y. et al. Analysis and evaluation of essential oil components of cinnamon barks using GC–MS and FTIR spectroscopy. **Industrial Crops and Products**, v. 41, p. 269-278, 2013.

LI, Z. et al. Current status and future prospects of grapevine anthracnose caused by *Elsinoe ampelina*: An important disease in humid grape-growing regions. **Molecular Plant Pathology**, v. 22, n. 8, p. 899-910, 2021.

LI, Z. et al. Infection process and host responses to *Elsinoë ampelina*, the causal organism of grapevine anthracnose. **European Journal of Plant Pathology**, v. 155, n. 2, p. 571-582, 2019.

LOPES JUNIOR, A. **Modelo de estimativa de ocorrência da antracnose na videira ‘Niagara Rosada’ baseado em parâmetros microclimáticos Campinas**. 2009. 81 f. Dissertação (Mestrado em Concentração Gestão de Recursos Agroambientais) – Instituto Agronômico, Campinas-SP.

LOPES, G. et al. Antifungal activity of phlorotannins against dermatophytes and yeasts: approaches to the mechanism of action and influence on *Candida albicans* virulence factor. **Plos One**, v. 8, n. 8, p. e72203, 2013.

LOPES, M. E. **Caracterização morfológica de isolados de *Colletotrichum* sp., agente causal da antracnose em goiabeira-serrana (*Acca sellowiana*) (O. Berg.) Burret**. 2013. 111 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC.

LOPEZ-REYES, J. G. et al. Efficacy of plant essential oils on postharvest control of rot caused by fungi on four cultivars of apples *in vivo*. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 25, n. 3, p. 171-177, 2010.

LORENA, F.; BICAS, J. Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais. **Química Nova na Escola**, v.39, n. 2, p. 120-130, 2017.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 512p.

MACWAN, S.R. et al. Essential oils from herbs and spices: their antimicrobial activity and application in food preservation. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v.5, n.5, p. 885–901, 2016.

MAEDA, J. A. et al. Craveiro-da-índia: características físicas das sementes e seus efeitos na germinação e desenvolvimento vegetativo. **Bragantia**, v. 49, n.1, p. 23-36, 1990.

MAIA, J. D. G. et al. A viticultura de mesa no Brasil: produção para o mercado nacional e internacional. **Territórios do Vin**. v. 9, p. 1-9, 2018.

MAIA, T. F. et al. Atividade antifúngica de óleos essenciais de plantas. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 17, n. 1, p. 105-116, 2015.

MANDELLI, F. et al. **Agrometeorologia dos cultivos: o fator meteorológico na produção agrícola**. In: Uva em clima temperado. 1. ed. Brasília: INMET, p. 503-515, 2009.

MAPA, Ministério da Agricultura e Abastecimento. **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários**, 2022. Disponível em:< [http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em: 25 jun. 2022.

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

MARIN-FELIX, Y. et al. Genera of phytopathogenic fungi: GOPHY 1. **Studies in mycology**, v. 86, p. 99-216, 2017.

MELLO, L.M.R. DE.; MACHADO, C. A. E. Vitivinicultura brasileira: panorama 2010. **Comunicado Técnico**. Embrapa: Embrapa Uva e Vinho, n. 223, p. 18, 2021.

MELLO, L.M.R. DE.; MACHADO, C. A. E. Vitivinicultura brasileira: panorama 2019. **Comunicado Técnico**. Embrapa: Embrapa Uva e Vinho, n. 214, p. 21, 2020.

MELLO, L.M.R. DE.; MACHADO, C. A. E. Vitivinicultura brasileira: panorama 2018. **Comunicado Técnico**. Embrapa: Embrapa Uva e Vinho, n. 210, p. 12, 2019.

MELO, L. G. de L. **Avaliação de parâmetros epidemiológicos da podridão por lasiodiplodia em uva nas cultivares Itália muscat e thompson seedless**. 2012. 51 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE.

MILHOLLAND, R. D. Ripe rot. **Compendium of Grape Diseases; Pearson, RC, Goheen, AC, Eds**, p. 23-24, 1988.

MIRANDA, C. A. S. F. et al. Óleos essenciais de folhas de diversas espécies: propriedades antioxidantes e antibacterianas no crescimento espécies patogênicas. **Revista Ciência Agronômica**, v. 47, n.1, p. 213-220, 2016.

MORAIS, L. A. S. Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Org.). **Óleos Essenciais no Controle Fitossanitário**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, v.1, p. 139- 151, 2009.

NANUCI, R. **Aplicação de fungicidas multissítios em mistura e de forma isolada no manejo da resistência de *Phakopsora Pachyrhizi* na soja**. 2019. 37 f. Dissertação (Mestrado em Proteção de Plantas) - Instituto Federal Goiano, Urutaí- GO.

NAVES, R. L. et al. Controle de doenças fúngicas em uvas de mesa no noroeste do Estado de São Paulo. **Circular Técnica**. Embrapa: Embrapa Uva e Vinho, n. 68, p. 17, 2006.

NAVES, R. L. et al. Sistema de produção de uva de mesa no Norte do Paraná: doenças e seu controle. **Sistema de Produção**. Embrapa: Embrapa Uva e Vinho, n.10, p. 9, 2005.

NEJAD, S. M. et al. Pharmacological and toxicological properties of eugenol. **Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 14, n. 2, p. 201, 2017.

NETO, D. D. Produção nacional de uvas e derivados avança em todos os segmentos. **Visão Agrícola** v.14, 2021. Disponível em:< <https://www.esalq.usp.br/visaoagricola/sites/default/files/va14-viticultura-capa-e-miolo-final.pdf>>. Acesso em: 24 jun. 2022.

NISAR, M. F. et al. Pharmacological properties and health benefits of eugenol: a comprehensive review. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2021, 2021.

NOGUEIRA JÚNIOR, A. F. et al. Videiras requerem monitoramento e combate às doenças de início e fim de ciclo. **Visão Agrícola** v.14, 2021. Disponível em:< <https://www.esalq.usp.br/visaoagricola/sites/default/files/va14-viticultura-capa-e-miolo-final.pdf>>. Acesso em: 24 jun. 2022.

OLIVEIRA P., F. et al. Investigation on mechanism of antifungal activity of eugenol against *Trichophyton rubrum*. **Medical Mycology**, v. 51, n. 5, p. 507-513, 2013.

OLIVEIRA, J. A. **Efeito do tratamento fungicida em sementes e no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativus L.*) e pimentão (*Capsicum annum L.*)**. 1991. 111p. Dissertação (Mestrado – Área de Concentração em Fitossanidade) – Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG.

OLIVEIRA, R. A. de et al. Constituintes químicos voláteis de especiarias ricas em eugenol. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 3, p. 771-775, 2009.

OOTANI, M. A. et al. Use of essential oils in agriculture. **Journal of biotechnology and biodiversity**, v. 4, n. 2, p. 162-175, 2013.

OSÓRIO, L. G. et al. Atividade *in vitro* do óleo essencial de *Origanum vulgare L.* em isolados clínicos de *Aspergillus* spp. **Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia**, v. 71, n. 1, p. 204-210, 2019.

OUYANG, Q. et al. Cinnamaldehyde exerts its antifungal activity by disrupting the cell wall integrity of *Geotrichum citri-aurantii*. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 55, 2019.

PAVELLA, R.; BENELLI, G. Essential Oils as Ecofriendly Biopesticides? Challenges and Constraints. **Trends in Plant Science**, v.21, p. 1000-1007, 2016.

PEDROTTI, C. et al. Controle alternativo da podridão da uva por óleos essenciais de duas espécies de eucalipto. **Revista da Ciência da Alimentação e Agricultura**, v. 99, n. 14, p. 6552-6561, 2019.

PERES, A. P. et al. Variabilidade morfocultural e genética de fungos associados à podridão peduncular do mamão. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, n. 5, p. 1053-1062, 2003.

PINA-VAZ, C. et al. Antifungal activity of *Thymus* oils and their major compounds. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 18, n. 1, p. 73-78, 2004.

PIRRELLO, C. et al. Emergent ascomycetes in viticulture: an interdisciplinary overview. **Frontiers in Plant Science**, v.10, p. 1-30, 2019.

PIVA, C. A. G. **Identificação e caracterização morfológica e molecular de *Colletotrichum* spp. E *Pestalotiopsis* spp. em videira**. 2017. 110 f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages-SC.

POOLSAWAT, O. et al. Laboratory and field evaluations of resistance to *Sphaceloma ampelinum* causing anthracnose in grapevine. **Australasian Plant Pathology**, v. 41, n. 3, p. 263-269, 2012.

PROTAS, J. F. DA S. et al. Vitivinicultura brasileira: regiões tradicionais e pólos emergentes. **Informe Agropecuário: Vinhos finos: rumo à qualidade**, v. 27, n. 234, p.7-15, 2006.

RAMOS, K. et al. Óleos essenciais e vegetais no controle in vitro de *Colletotrichum gloeosporioides*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 2, p. 605-612, 2016.

RANA, I. S. et al. Evaluation of antifungal activity in essential oil of the *Syzygium aromaticum* (L.) by extraction, purification and analysis of its main component eugenol. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 4, p. 1269-1277, 2011.

RAO, J. et al. Improving the efficacy of essential oils as antimicrobials in foods: mechanisms of action. **Annual Review Food**, v.10, p. 365-387, 2019.

RIFFEL, A.; COSTA, J. G. Os voláteis de plantas e o seu potencial para a agricultura. **Documentos**. Embrapa: Embrapa Tabuleiros Costeiros, n. 201, p. 48, 2015.

ROZWALKA, L. C. et al. Chemical components of essential oils as a base to control two grape pathogens: *Sphaceloma ampelinum* and *Pseudocercopora vitis*. **Journal of Phytopathology**, v. 168, n. 6, p. 342-352, 2020.

SAAD, N.Y. et al. Main bioactivities and mechanism of action of essential oils and their components. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 28, n. 5, p. 269-279, 2013.

SANTOS, R. F. et al. Phylogeny, morphology and pathogenicity of *Elsinoë ampelina*, the causal agent of grapevine anthracnose in Brazil and Australia. **Journal of Phytopathology**, v. 166, n. 3, p. 187-198, 2018.

SANTOS, R. F.; SPÓSITO, M. B. Improving assessments of anthracnose severity on grapevine leaves through the development of a standard area diagram set. **Australasian Plant Pathology**, v. 47, n. 4, p. 357-364, 2018.

SARACINO, I. M. et al. Antifungal activity of natural compounds vs. *candida* spp.: a mixture of cinnamaldehyde and eugenol shows promising *in vitro* results. **Antibiotics**, v. 11, n. 1, p. 73, 2022.

SAWANT, I. S. et al. D. Emergence of *Colletotrichum gloeosporioides* sensu lato as the dominant pathogen of anthracnose disease of grapes in India as evidenced by cultural, morphological and molecular data. **Australasian Plant Pathology**, v.41, p. 493-504, 2012.

SHAH, G. et al. Pharmacognostic parameters of *Eucalyptus globulus* leaves. **Pharmacognosy Journal**, v. 4, n. 34, p. 38-43, 2012.

- SHALA, A. Y.; GURURANI, M. A. Phytochemical Properties and Diverse Beneficial Roles of *Eucalyptus globulus* Labill.: A Review. **Horticulturae**, v. 7, n. 11, p. 450, 2021.
- SHEAR, C.L. Bary's *Sphaceloma ampelinum* Life Story. **Phytopathology**, v.19, p.673-679, 1929.
- SHREAZ, S. et al. Cinnamaldehyde and its derivatives, a novel class of antifungal agents. **Fitoterapia**, v. 112, p. 116-131, 2016.
- SILVA, C. S. et al. Óleo essencial da canela (cinamaldeído) e suas aplicações biológicas. **Revista De Investigação Biomédica**, v. 9, n. 2, p. 192-197, 2018.
- SILVA, J. N. da. et al. Characterization of tropical viticulture in the fluminense north and northwest regions. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 41, n. 6, p. 1-8, 2019.
- SILVEIRA, J. C. et al. Levantamento e análise de métodos de extração de óleos essenciais. **Enciclopédia Biosfera**, v. 8, n. 15, p. 1-15, 2012.
- SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Artmed Editora, 2016.
- SÔNEGO, O. R. et al. Principais doenças fúngicas da videira no Sul do Brasil. **Circular Técnica**. Embrapa: Embrapa Uva e Vinho, n. 56, p. 1-32, 2005.
- SÔNEGO, O. R. et al. Uva para processamento Fitossanidade. **Informação Tecnológica**. Embrapa: Embrapa Uva e Vinho, n.35, p. 1-11, 2003.
- SOUZA, A. et al. Lack of host specificity of *Colletotrichum* spp. isolates associated with anthracnose symptoms on mango in Brazil. **Plant Pathology**, v. 62, n. 5, p. 1038-1047, 2013.
- SUTTON, B. C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. **In Colletotrichum: Biology, Pathology and Control**, p. 1-26, 1992.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Universitat Jaume I, 2006.
- THAN, P. P. et al. Characterization and pathogenicity of *Colletotrichum* species associated with anthracnose on chilli (*Capsicum* spp.) in Thailand. **Plant pathology**, v. 57, n. 3, p. 562-572, 2008.
- THIND, T. S. Anthracnose. In: **Compendium of grape diseases, disorders, and pests**. 2 ed. Saint Paul: American Phytopathological Society, 2015.
- TOMAZONI, E. Z. et al. *In vitro* and *in vivo* activity of essential oils extracted from *Eucalyptus staigeriana*, *Eucalyptus globulus* and *Cinnamomum camphora* against *Alternaria solani* Sorauer causing early blight in tomato. **Scientia Horticulturae**, v. 223, p. 72-77, 2017.

- TOZZE JÚNIOR, H. J. et al. Caracterização de isolados de *Colletotrichum* spp. associados às frutíferas no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, v. 41, p. 270-280, 2015.
- TOZZE JÚNIOR, H. J. et al. Morphological and physiological characterization of *Colletotrichum* sp. isolates from solanaceous crops. **Summa Phytopathologica**, v. 32, p. 71-79, 2006.
- VANGALAPATI, M. et al. A review on pharmacological activities and clinical effects of cinnamon species. **Research Journal of pharmaceutical, biological and chemical sciences**, v. 3, n. 1, p. 653-663, 2012.
- VELOZ, A. L. M. et al. Application of essential oils and polyphenols as natural antimicrobial agents in postharvest treatments: Advances and challenges. **Food Science & Nutrition**, v. 8, n. 6, p. 2555-2568, 2020.
- VIEGAS, E.C. et al. Toxicidade de óleos essenciais de alho e casca de canela contra fungos do grupo *Aspergillus flavus*. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.23, n.4, p. 915-919, 2005.
- VIEIRA, M. et al. Chemical composition, antibacterial, antibiofilm and synergistic properties of essential oils from *Eucalyptus globulus* Labill. and seven Mediterranean aromatic plants. **Chemistry & biodiversity**, v. 14, n. 6, p. e1700006, 2017.
- VITTI, A.; BRITO, J. Óleo essencial de eucalipto. **Documentos Florestais**, n.17, p. 1-30, 2003.
- WANG, C. et al. Antifungal activity of eugenol against *Botrytis cinerea*. **Tropical Plant Pathology**, v. 35, n. 3, p. 137-143, 2010.
- WEI, J. et al. Antifungal activity of cinnamaldehyde against *Fusarium sambucinum* involves inhibition of ergosterol biosynthesis. **Journal of Applied Microbiology**, v. 129, n. 2, p. 256-265, 2020.
- WEIR, B. S. et al. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. **Studies in mycology**, v. 73, p. 115-180, 2012.
- WHITELAW-WECKERT, M. A. et al. Phylogenetic relationships and pathogenicity of *Colletotrichum acutatum* isolates from grape in subtropical Australia. **Plant Pathology**, v. 56, n. 3, p. 448-463, 2007.
- WU, M. et al. Terpenoids and their biological activities from *Cinnamomum*: A review. **Journal of Chemistry**, v. 2020, 14 p. 1-14, 2020.
- WU, Y. et al. Cinnamaldehyde inhibits the mycelial growth of *Geotrichum citri-aurantii* and induces defense responses against sour rot in citrus fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 129, p. 23-28, 2017.
- XIE, Y. et al. Structure-activity relationships of cinnamaldehyde and eugenol derivatives against plant pathogenic fungi. **Industrial Crops and Products**, v. 97, p. 388-394, 2017.

YAN, J. et al. Diverse species of *Colletotrichum* associated with grapevine anthracnose in China. **Fungal diversity**, v. 71, n. 1, p. 233-246, 2015.

YEH, H. et al. Methods for thermal stability enhancement of leaf essential oils and their main constituents from indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*). **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 61, n. 26, p. 6293-6298, 2013.

ZACARONI, L. M. et al. Potencial fungitóxico do óleo essencial de *Piper hispidinervum* (pimenta longa) sobre os fungos fitopatogênicos *Bipolaris sorokiniana*, *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum gloeosporioides*. **Acta amazônica**, v. 39, p. 193-197, 2009.

ZANUS, M. C. Panorama da vitivinicultura brasileira. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE VITICULTURA E ENOLOGIA. 2015. Bento Gonçalves. **Anais...** Bento Gonçalves, RS: Universidade Federal do Pampa, 2015, p. 217-219.

# ANEXOS

## ANEXO A- CROMATOGRAFIA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Syzygium aromaticum*

QUINARÍ UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Exatas  
Departamento de Química / Colegiado de Extensão  
Telefax : (31) 3409-5724 – e-mail: núcleo@qui.ufmg.br



### CERTIFICADO DE ANÁLISE QUÍMICA

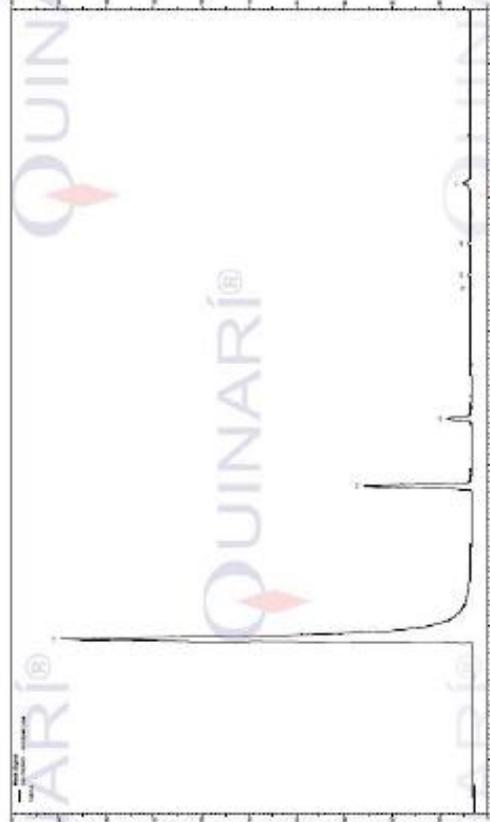
Solicitante: **QUINARÍ FRAGRÂNCIAS E COSMÉTICOS LTDA.** CNPJ: 05.424.392/0001-30

#### ÓLEO ESSENCIAL de CRAVO

Nome comercial: Óleo Essencial de Cravo  
Nomenclatura botânica: *Eugenia caryophyllus*  
Parte da planta: Folhas e Botões  
Extração: Arraste a vapor  
Origem: Indonésia

#### Composição Química

Pico	IR	Constituintes	%
1	1334	eugenol	87.7
2	1408	$\beta$ -carofileno	8.5
3	1441	humuleno	2.1
4	1505	$\beta$ -selineno	0.1
5	1511	acetato eugenila	0.2
6	1527	elemol	0.2
7	1556	óxido carofileno	1.0
		outros	0.3



Método de análise: Cromatografia Gasosa de Alta Resolução. Cromatógrafo a Gás AGILENT 7820A.  
Coluna: RXI-1MS 30m x 0,25mm x 0,25  $\mu$ m (Restek). Temp.: Coluna: 50°C (0 min), 3°C/min a 200°C.  
Injetor: 200°C Split: 1/50. Detector: FID: 220°C. Vol. de injeção: 1  $\mu$ l (conc. 2,0 % em acetato de etila).

*Syzygium*

Dra. Vany Ferraz  
Laboratório de Cromatografia  
Departamento de Química – UFMG  
vanyferraz@ufmg.br  
Belo Horizonte

ANEXO B- CROMATOGRAFIA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Eucalyptus globulus*CENTRAL  
ANALÍTICAUNISC  
UNIVERSIDADE DO OESTE DO PARANÁ

RELATÓRIO DE ENSAIO Nº: 155732/21

Ordem de Serviço Nº: 5199/2021

Página 01 de 02

**Cliente**

Guilneri Fragrâncias e Cosméticos LTDA  
Rua Dr. Paula Xavier, 1304 - Bairro: Centro - Ponta Grossa - PR - CEP: 84010-270  
Telefone: (42) 3225-1700  
Contato: Wagner Azambuja

**DADOS DA AMOSTRA (Informados pelo cliente)**

Tipo: Óleo essencial  
Planta e parte utilizada: Óleo essencial de Eucalypto globulus  
Nome científico: Eucalyptus globulus  
Processo de extração: Destilação a vapor das folhas e galhos  
Data da extração: Aprox. mai/2022  
Cultivo/Localização: Portugal  
Identificação: EGD1UNISC  
Responsável pela coleta: O cliente  
Informações adicionais: -

**DATAS DO LABORATÓRIO**

Data de entrada no laboratório: 08/07/2021  
Período de análise: 09/07/2021 a 03/08/2021

**Resultados****PERFIL CROMATOGRAFICO**

Áreas relativas dos picos referentes aos compostos identificados na amostra:

Nome	Área relativa (%)	Similaridade (%)	Tempo de retenção (min)	CAS#*
α-Pineno	7,55	98,85	6,42	80-56-8
β-Pineno	0,67	98,31	7,67	18172-67-3
β-Mirceno	1,77	98,48	8,06	123-35-3
α-Felandreno	2,01	98,38	8,51	99-83-2
α-Terpineno	0,31	96,81	8,90	99-86-6
α-Cimeno	19,19	97,39	9,17	527-84-4
Eucaliptol	57,57	99,53	9,41	470-82-6
trans-β-Ocimeno	0,64	97,44	9,57	3779-61-1
γ-Terpineno	4,02	99,30	10,27	99-85-4
Pinocaradiol	0,21	95,70	12,97	547-61-6
Terpinen-4-ol	0,97	98,26	14,28	20126-76-6
α-Terpineol	4,64	98,29	14,73	98-55-6

Soma das áreas dos picos identificados: 99,57  
Soma das áreas dos picos não identificados: 0,43

Na tabela acima apresenta-se a lista de compostos identificados, as áreas relativas dos picos, grau de similaridade com a biblioteca de compostos referência, o tempo de retenção na coluna e o código de registro no CAS.

\* Compostos com baixa similaridade com os espectros da Biblioteca devido à baixa concentração e/ou coeluição.

\*\*O registro CAS de um composto químico é um número com um registro único no banco de dados do "Chemical Abstracts Service" que atribui esses números a cada produto químico que é descrito na literatura.