



Efficiency of essential oils to control *Colletotrichum theobromicola* *in vitro*

Eficiência de óleos essenciais no controle de Colletotrichum theobromicola in vitro

Tiago Silva Lima^{1*}, Yoah Nayara Caetano da Silva Melo², Jackeline Laurentino da Silva³, Jaqueline Figueredo de Oliveira Costa⁴, Gaus Silvestre de Andrade Lima⁵, Iraíldes Pereira Assunção⁶

Abstract: Essential oils promote the inhibitory control of several fungi, including those within the genus *Colletotrichum*, the causal agent of Anthracnose, a disease which may occur at any stage of development in various crops, reducing up to 70% of crop production in some cases. Thus, the use of alternative products constitutes an important strategy for the integrated management, promoting less persistent molecules in the environment and lower toxicity rates, providing health benefits to producers and consumers of agricultural products. In this context, the present study evaluated the *in vitro* fungitoxic effect of essential oils from Java citronella (*Cymbopogon winterianus*), clove (*Syzygium aromaticum*), eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) and rose pepper (*Schinus terebinthifolius*) on the mycelial growth of *Colletotrichum theobromicola*. The experiment was performed under completely randomized design, in a 4x5 factorial scheme (4 essential oils x 5 concentrations), with five replications, and the experimental unit consisting of a Petri dish. The treatments were generated by combining the concentrations (0, 5, 10, 15, 25 and 50 $\mu\text{L mL}^{-1}$) of essential oils (citronella, clove, eucalyptus and rose pepper). The plates were inoculated with the pathogen *C. theobromicola* and incubated for seven days at 25 ± 2 °C. To verify the difference between treatments, the percentage of mycelial growth inhibition (PGI) was estimated. The mycelial growth of *C. theobromicola* was significantly reduced with increasing concentrations of essential oils. At a concentration of 50 $\mu\text{L mL}^{-1}$, the essential oil from *S. terebinthifolius* showed the best result inhibiting 54.57% of mycelial growth, followed by the oil from *S. aromaticum* (49.26%), *C. winterianus* (23.70%) and *E. globulus* (17.90%). All the studied oils showed antifungal activity.

Key words: Alternative control. Anthracnose. Natural fungicide.

Resumo: O emprego de óleos essenciais promove o controle inibitório de diversos fungos, entre esses o gênero *Colletotrichum*, agente causal responsável por uma das principais doenças, a Antracnose, a qual se manifesta em todos os estágios de desenvolvimento, reduzindo até 70% da produção em algumas culturas. Dessa forma, o emprego desses produtos alternativos auxilia como importante estratégia no manejo integrado, apresentando menor persistência no meio ambiente e baixa toxicidade, proporcionando benefícios à saúde dos produtores e dos consumidores de produtos agrícolas. Nesse contexto, o presente estudo avaliou o efeito fungitóxico *in vitro* dos óleos essenciais de citronela (*Cymbopogon winterianus*), cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), eucalipto (*Eucalyptus globulus*) e pimenta-rosa (*Schinus terebinthifolius*) sobre o crescimento micelial de *Colletotrichum theobromicola*. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4x5 (4 óleos essenciais x 5 concentrações), com cinco repetições, sendo a unidade experimental constituída por uma placa de Petri. Os tratamentos foram gerados pela combinação das concentrações (0; 5; 10; 15; 25 e 50 $\mu\text{L mL}^{-1}$) dos óleos essenciais (citronela, cravo-da-índia, eucalipto e pimenta-rosa). As placas foram inoculadas com o patógeno *C. theobromicola* e incubadas por sete dias a 25 ± 2 °C. Para verificar a diferença entre os tratamentos foi estimada a porcentagem de inibição de crescimento micelial (PIC). O crescimento micelial de *C. theobromicola* foi reduzido significativamente com o aumento das concentrações dos óleos essenciais. Na concentração de 50 $\mu\text{L mL}^{-1}$, o óleo essencial de *S. terebinthifolius* apresentou o melhor resultado de inibição micelial (54,57%) do fungo, seguido dos óleos de *S. aromaticum* (49,26%), *C. winterianus* (23,70%) e *E. globulus* (17,90%). Os óleos estudados apresentaram atividade antifúngica.

Palavras-chave: Controle alternativo. Antracnose. Fungicida natural.

*Corresponding author

Submitted for publication on 12/04/2021, approved on 08/07/2021 and published on 07/09/2021

¹Doutorando em Proteção de Plantas, Universidade Federal de Alagoas, UFAL, Rio Largo – AL, Brasil. E-mail: lima_tiago92@outlook.com;

²Graduanda do curso de Agroecologia, Universidade Federal de Alagoas, UFAL, Rio Largo – AL, Brasil. E-mail: yoahnayara@hotmail.com;

³Doutoranda em Proteção de Plantas, Universidade Federal de Alagoas, UFAL, Rio Largo – AL, Brasil. E-mail: jackeline.laurentino@outlook.com;

⁴Professora Doutora, Universidade Federal de Alagoas, UFAL, Rio Largo – AL, Brasil. E-mail: jaquelinefigueredo@hotmail.com;

⁵Professor Doutor, Universidade Federal de Alagoas, UFAL, Rio Largo – AL, Brasil. E-mail: gausandrade@yahoo.com.br;

⁶Professora Doutora, Universidade Federal de Alagoas, UFAL, Rio Largo – AL, Brasil. E-mail: iraildes.assuncao@ceca.ufal.br;

INTRODUCTION

Plant pathogenic fungi answer for relevant global agricultural production losses (BRZEZINSKA, 2014). Fungi within the genus *Colletotrichum* are considered among the main plant pathogens due to their wide geographical distribution, extensive variety of susceptible hosts and high number of plant pathogenic species (DEAN *et al.*, 2012). Among the species within this genus, *Colletotrichum theobromicola* causes the disease known as anthracnose in various crops with economic significance in many countries (WEIR *et al.*, 2012; RODRIGUES *et al.*, 2014; COSTA *et al.*, 2019). The disease may occur at any stage of plant development, infecting leaves, shoots, flowers and fruits, and reducing up to 70% of crop production (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 2014).

Symptoms of anthracnose on leaves consist of small circular spots with yellowish halos which become chlorotic and fall, causing premature defoliation (MUNHUWEYI *et al.*, 2016). In fruits it expresses itself as circular or irregular lesions of dark-brown or bright-brown color which expand with fruit maturation. Fruits show an oily appearance, with depressions and dry appearance, with fruit flesh being damaged. The disease may also express as a soft rot and cause fruit drop (KIMATI *et al.*, 2011). Temperature and high relative humidity contribute to the development of the disease, resulting in significant losses due to the difficult control (GHINI *et al.*, 2011).

Plant sanitary problems observed in the field are minimized through the conventional agricultural system based on the utilization of fertilizers and highly toxic chemical pesticides. Such agriculture model causes biological and ecological imbalances (TAKESHITA *et al.*, 2014) and various problems to human health (SHEAHAN *et al.*, 2017). The indiscriminate use of those products may also favor the occurrence of resistant pathogens, leading to the necessity for a progression of stronger chemical products which in turn will cause more significant damages, including higher production costs (PERINA *et al.*, 2015), environmental contamination (SILVA; MELO, 2013) and higher quantity of food residues, which restricts exportation of agricultural products (BALLESTE *et al.*, 2020).

In this view, several studies try to identify natural products which may have on its constitution substances with fungitoxic properties that may be employed to control pathogens of important crops, with less risk for human health and less environmental issues (LIMA *et al.*, 2019). Among natural products, essential oils fit within these characteristics, being constituted by complex compounds elaborated from secondary metabolites from plants and with low toxicity to humans (RAUT; KARUPPAYIL, 2014).

INTRODUÇÃO

Os fungos fitopatogênicos são responsáveis por relevantes perdas na produção agrícola mundial (BRZEZINSKA, 2014). Entre esses, o gênero *Colletotrichum* é considerado um dos principais devido à ampla distribuição geográfica, grande variedade de hospedeiros suscetíveis e elevado número de espécies fitopatogênicas (DEAN *et al.*, 2012). Entre as espécies desse gênero, o *Colletotrichum theobromicola* causa a doença chamada antracnose, que infecta culturas de importância econômica em vários países (WEIR *et al.*, 2012; RODRIGUES *et al.*, 2014; COSTA *et al.*, 2019) e se manifesta em todos os estágios de desenvolvimento, atacando folhas, brotações, flores e frutos de qualquer idade, reduzindo até 70% da produção em algumas culturas (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 2014).

Os sintomas da antracnose nas folhas consistem em pequenas manchas circulares com halos amarelos que se tornam cloróticas e caem, acarretando desfolhamento prematuro (MUNHUWEYI *et al.*, 2016). Nos frutos, apresentam-se em forma de lesões circulares ou irregulares de coloração pardo-clara a pardo-escura, aumentando de tamanho de acordo com a maturação do fruto. Os frutos apresentam aparência oleosa, deprimidos e murchos, afetando a polpa. Podem se apresentar, ainda, na forma de podridão mole e provocar queda dos frutos (KIMATI *et al.*, 2011). Temperatura e umidade elevada contribuem para o desenvolvimento dessa doença, resultando em grandes prejuízos decorrentes do difícil controle (GHINI *et al.*, 2011).

Os problemas fitossanitários relatados no campo são minimizados por meio do sistema convencional de produção agrícola, que se baseia na aplicação de fertilizantes e pesticidas químicos altamente tóxicos. Esse modelo de agricultura promove desequilíbrios biológicos e ecológicos (TAKESHITA *et al.*, 2014), além de vários problemas à saúde humana (SHEAHAN *et al.*, 2017). O uso indiscriminado desses produtos também pode favorecer o surgimento de patógenos resistentes, necessitando da aplicação progressiva de agroquímicos mais fortes que irá proporcionar danos ainda mais relevantes, como o aumento dos custos de produção (PERINA *et al.*, 2015), contaminação do meio ambiente (SILVA; MELO, 2013), maior quantidade de resíduos em alimentos, o que limita a exportação de produtos agrícolas (BALLESTE *et al.*, 2020).

Nesse contexto, vários estudos vêm buscando identificar produtos naturais que apresentem na composição substâncias com propriedades fungitóxicas e que sejam capazes de ser empregadas no controle de patógenos prejudiciais às culturas, e que sejam menos agressivos ao meio ambiente e à saúde humana (LIMA *et al.*, 2019). Entre os produtos naturais, os óleos essenciais se enquadram nessas características, constituídos por compostos complexos elaborados a partir de metabólitos secundários das plantas e com baixa toxicidade a humanos (RAUT; KARUPPAYIL, 2014).

Properties of the essential oils from Java citronella (*Cymbopogon winterianus* Jowitt), clove (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr; L. M. Perry), eucalyptus (*Eucalyptus globulus* Labill) and rose pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi) were studied by diverse researchers and their biological activities, including antifungal activity, were described in the literature (CRUZ *et al.*, 2015; ARRUDA *et al.*, 2019; LIMA *et al.*, 2019; MOHAMED *et al.*, 2020). The utilization of essential oils promotes the inhibitory control of many fungi, including those from the genus *Colletotrichum* (RAMOS *et al.*, 2016; CRUZ *et al.*, 2017), exhibiting less persistence in the environment and low toxicity, providing benefits for farmers and consumers' health. Thus, the objective of the present work was to evaluate the effect of essential oils from *C. winterianus*, *S. aromaticum*, *E. globulus* and *S. terebinthifolius* on the mycelial growth of *Colletotrichum theobromicola* in vitro.

MATERIAL AND METHODS

The experiment was completed at the Laboratory of Phytopathology at the Campus for Engineering and Agricultural Sciences (CECA) from the Federal University of Alagoas (UFAL), located at the km 85 of the BR 101 North highway (9°27'54.71"S – 35°49'39.27"W), in the municipality of Rio Largo, 27 km from the city of Maceió, the capital of the state of Alagoas, Brazil.

The isolate used in the experiment was obtained from the phytopathogens' collection from the Federal University of Alagoas (COUFAL), originated from leaves from *Anonaceae* species exhibiting anthracnose in a commercial plantation in the state of Alagoas and identified as *Colletotrichum theobromicola* through Bayesian Inference, based on multilocus analysis of genes actin (ACT), β -tubulin (TUB2), calmodulin (CAL), chitin synthase (CHS-1), manganese superoxide dismutase (SOD), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and the region of the internal transcribed spacer (ITS) (COSTA *et al.*, 2019).

The experiment was performed under completely random design, in a factorial 4x5 (4 essential oils x 5 concentrations). Concentrations were established at 5; 10; 15; 25 and 50 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Five replicates were used for each treatment, considering one Petri dish as the experimental unit.

Oils selected for the experiment were previously recorded in the literature as promising against different pathogens. Concentrations were also determined based on literature (CRUZ *et al.*, 2015; ARRUDA *et al.*, 2019; LIMA *et al.*, 2019; MOHAMED *et al.*, 2020). In order to obtain the final concentrations the method of direct dilution in culture medium was used (PEREIRA *et al.*, 2006).

As propriedades dos óleos essenciais de citronela (*Cymbopogon winterianus* Jowitt), cravo da Índia (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr; L. M. Perry), eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill) e pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi) foram estudadas por diversos pesquisadores, e suas atividades biológicas, incluindo atividade antifúngica, foram relatadas na literatura (CRUZ *et al.*, 2015; ARRUDA *et al.*, 2019; LIMA *et al.*, 2019; MOHAMED *et al.*, 2020). O emprego de óleos essenciais promove o controle inibitório de diversos fungos, incluindo o gênero *Colletotrichum* (RAMOS *et al.*, 2016; CRUZ *et al.*, 2017), apresentando menor persistência no meio ambiente e baixa toxicidade, proporcionando benefícios à saúde dos produtores e consumidores de produtos agrícolas. Assim, objetivou-se avaliar o efeito dos óleos essenciais de *C. winterianus*, *S. aromaticum*, *E. globulus* e *S. terebinthifolius* no crescimento micelial de *Colletotrichum theobromicola*.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia do Campus de Engenharias e Ciências Agrárias (CECA) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), localizado no km 85 da BR 101 Norte (9°27'54.71"S – 35°49'39.27"O), no Município de Rio Largo, situado a 27 km da cidade de Maceió, capital do estado de Alagoas.

O isolado utilizado no experimento, proveniente da coleção de fitopatógenos da Universidade Federal de Alagoas (COUFAL), foi obtido de sintomas de antracnose em folhas de anonáceas em plantio comercial no estado de Alagoas e identificado por Inferência Bayesiana baseados nas análises multi-locus dos genes actina (ACT), β -tubulina (TUB2), calmodulina (CAL), chitina sintase (CHS-1), manganese-superóxido dismutase (SOD), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e região do espaço interno transcrito (ITS), como *Colletotrichum theobromicola* (COSTA *et al.*, 2019).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4x5 (4 óleos essenciais x 5 concentrações). As concentrações consistiram em 5; 10; 15; 25 e 50 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Para cada tratamento foram empregadas cinco repetições, sendo a unidade experimental uma placa de Petri.

Os óleos selecionados para o estudo tinham resultados promissores relatados em diferentes trabalhos e com patógenos distintos. As concentrações foram definidas com base na literatura (CRUZ *et al.*, 2015; ARRUDA *et al.*, 2019; LIMA *et al.*, 2019; MOHAMED *et al.*, 2020). Para obter as concentrações finais, utilizou-se o procedimento de diluição direta em meio de cultura (PEREIRA *et al.*, 2006).

The essential oils were purchased in the local market, with oils from *S. aromaticum* and *E. globulus* being from Bioessência® and *C. winterianus* and *S. terebinthifolius* from Via Aroma®. The products were extracted by steam distillation, according specifications and methodology from the manufacturers.

Mycelium disks of *C. theobromicola* with 5 mm diameter were obtained from the margin of the colonies, after 7 days growing in Potato Dextrose Agar (PDA) medium and were placed in Petri dishes containing synthetic PDA (20 mL of culture medium per Petri dish) supplemented with the essential oils at test concentrations. The concentration 0 $\mu\text{L mL}^{-1}$ corresponded to the control. The experimental control consisted of Petri dishes containing only synthetic PDA medium, where the disks containing the pathogen were set.

Petri dishes containing the pathogen were incubated in a Biochemical Oxygen Demand (BOD) chamber at 25°C and photoperiod of 12 h. Seven days after inoculation the evaluation of mycelial growth was performed, consisting in measuring the diameter of colonies, obtained by the mean value of two perpendicular measures using a digital caliper. Results were used to calculate the percentage of mycelial growth inhibition (PGI) according to the formula (1).

$$PGI = \frac{(\text{Witness growth} - \text{Treatment growth}) \times 100}{(\text{Witness growth})} \quad (1)$$

Data was submitted to analysis of variance (ANOVA) and means were compared by the Tuckey test at 5% probability using the software SISVAR®. In order to verify the effect of different concentrations from different essential oils on *C. theobromicola* growth, the regression model was used for the *in vitro* experimental data using the software Past, version 2.17c.

RESULTS

Essential oils from Java citronella (*C. winterianus*), clove (*S. aromaticum*), eucalyptus (*E. globulus*) and rose pepper (*S. terebinthifolius*) reduced the mycelial growth of *Colletotrichum theobromicola* up to 40%, *in vitro*. Oils from *S. terebinthifolius* and *S. aromaticum* were the most efficient (Figure 1).

Os óleos essenciais foram adquiridos no comércio local, sendo *S. aromaticum* e *E. globulus* da marca Bioessência®; *C. winterianus* e *S. terebinthifolius* da marca Via Aroma. Os produtos foram extraídos por destilação a vapor, de acordo com metodologia e especificações próprias dos fabricantes.

Discos de micéliode 5 mm, diâmetro da espécie *C. theobromicola*, foram removidos da margem da colônia, com 7 dias de crescimento em meio de Batata-Dextrose-Ágar (BDA) e depositados em placas de Petri contendo meio BDA sintético (20 mL de meio de cultura por placa de Petri), suplementado com os óleos essenciais nas concentrações testadas. A concentração 0 $\mu\text{L mL}^{-1}$ correspondeu a testemunha. Para a testemunha foram utilizadas placas de Petri contendo apenas meio de cultura BDA sintético onde foram depositados discos do patógeno.

As placas contendo o patógeno foram incubadas em estufa Biochemical Oxygen Demand (BOD) a 25°C e fotoperíodo de 12 h. Aos 7 dias após a inoculação, foi realizada a avaliação do crescimento micelial do fungo que consistiu em medições do diâmetro das colônias, obtidas pela média de duas medições perpendiculares, utilizando paquímetro digital. Os resultados foram submetidos ao cálculo da porcentagem de inibição micelial (PIC) de acordo com a fórmula (1).

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo Teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade, utilizando o programa SISVAR®. Para verificar o efeito das diferentes concentrações dos distintos óleos essenciais sobre o crescimento de *C. theobromicola* foi utilizado o modelo de regressão sobre os dados do experimento *in vitro* usando o programa Past, versão 2.17c.

RESULTADOS

Os óleos essenciais de citronela (*C. winterianus*), cravo (*S. aromaticum*), eucalipto (*E. globulus*) e pimenta rosa (*S. terebinthifolius*) reduziram o crescimento micelial *in vitro* de *Colletotrichum theobromicola* em até 40%. Observou-se que os óleos de *S. terebinthifolius* e *S. aromaticum* foram superiores aos demais (Figura 1).

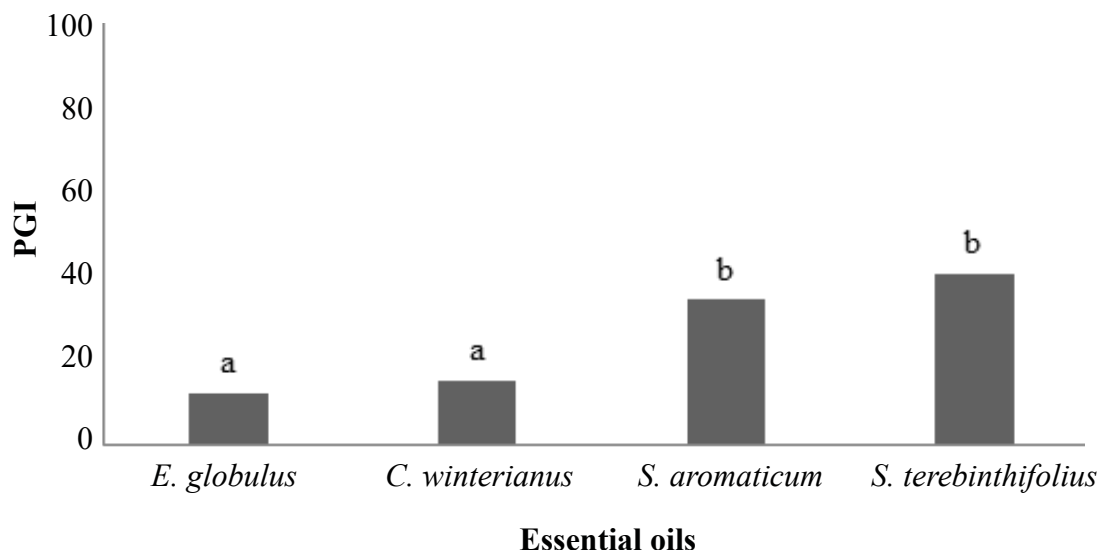


Figure 1 - *In vitro* percentage of mycelial growth inhibition (PGI) of *Colletotrichum theobromicola* with different essential oils studied.

Eucalyptus globulus; *Cymbopogon winterianus*; *Schinus terebinthifolius* and *Syzygium aromaticum*. Different letters represent significant differences between treatments by the Tukey test ($p \leq 0.05$).

Figura 1 - Porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) *in vitro* de *Colletotrichum theobromicola* dos diferentes óleos essenciais estudados.

Eucalyptus globulus; *Cymbopogon winterianus*; *Schinus terebinthifolius* e *Syzygium aromaticum*. Letras diferentes representam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

The effect of dosages of essential oils on *C. theobromicola* mycelial growth *in vitro* was described by the linear model (Figures 2A and 2D), showing the increase of oil concentration, independently of the oil origin, favored the inhibition of mycelial growth. The maximum dosage studied ($50 \mu\text{L mL}^{-1}$) of different essential oils, inhibited up to 55% of the mycelial growth. Oils from *S. terebinthifolius* (55%) (Figure 2D) and *S. aromaticum* (49%) (Figure 2B) were superior, however, all essential oils were effective to control the pathogen.

Results observed in Figures 2A and 2D are important, considering a potential alternative and innovative strategy to control this fungus, once there is no record in literature on studies concerning the effect of essential oils from *S. terebinthifolius*, *S. aromaticum*, *C. winterianus* and *E. globulus* inhibiting *C. theobromicola*.

O efeito das doses dos óleos essenciais na redução do crescimento micelial de *C. theobromicola in vitro* foi descrito por modelo linear (Figuras 2A a 2D), indicando que o aumento da concentração do óleo, independentemente do tipo de óleo, favoreceu sua inibição. A dose máxima estudada de $50 \mu\text{L mL}^{-1}$ dos distintos óleos essenciais inibiu em até 55% o crescimento micelial. Os óleos de *S. terebinthifolius* (55%) (Figura 2D) e *S. aromaticum* (49%) (Figura 2B) foram superiores aos demais. Mas todos os óleos foram efetivos no controle do patógeno.

Os resultados observados nas Figuras 2A a 2D se revestem de importância como estratégia alternativa e inovadora no controle desse fungo, uma vez que não há relato em outros estudos sobre o efeito dos óleos essenciais *S. terebinthifolius*, *S. aromaticum*, *C. winterianus* e *E. globulus* na inibição de *C. theobromicola*.

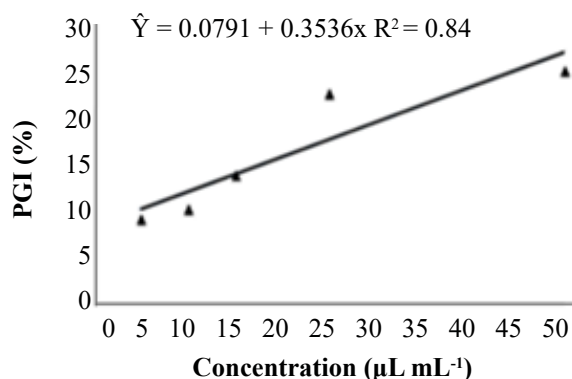
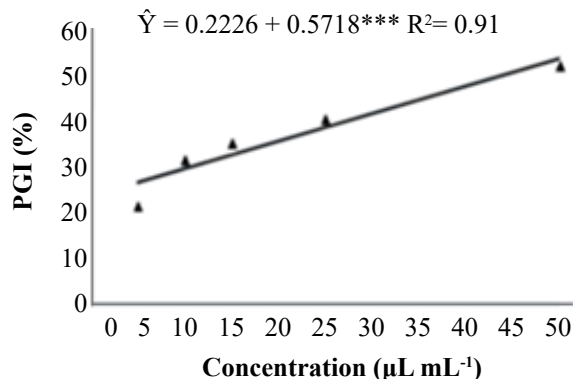
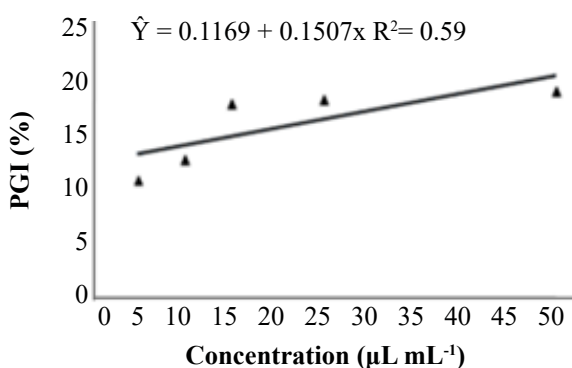
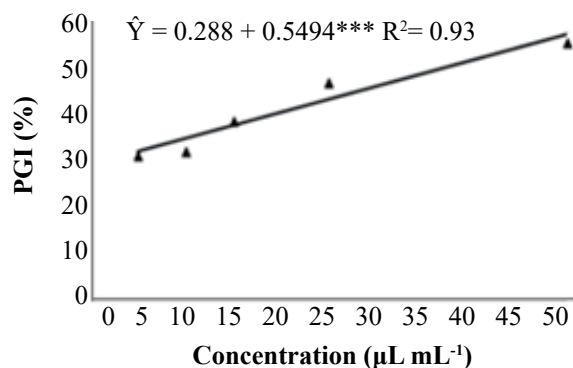
(A) *C. winterianus***(B) *S. aromaticum*****(C) *E. globulus*****(D) *S. terebinthifolius***

Figure 2 - Percentage of inhibition of *Colletotrichum theobromicola* mycelial growth according to different concentrations of essential oils.

A – *Cymbopogon winterianus*; B – *Syzygium aromaticum*; C - *Eucalyptus globulus*; D - *Schinus terebinthifolius*. *** $p \leq 0.001$ pelo test F.

Figura 2 - Porcentagem de inibição micelial no crescimento de *Colletotrichum theobromicola* em função de diferentes concentrações dos óleos essenciais estudados.

A – *Cymbopogon winterianus*; B – *Syzygium aromaticum*; C - *Eucalyptus globules*; D - *Schinus terebinthifolius*. *** $p \leq 0,001$ pelo teste F.

DISCUSSION

Essential oils promote microbial control due to their high chemical complexity, derived from their diverse components. These components act through different mechanisms on different targets, simultaneously. These characteristics are advantageous when compared to synthetic fungicides, reducing the possibility of pathogen resistance (LIMA *et al.*, 2019).

DISCUSSÃO

Os óleos essenciais promovem controle microbiano, em virtude da sua alta complexidade química, proveniente de diversos constituintes. Esses constituintes agem por mecanismos de ação distintos em diferentes alvos simultaneamente. Essas características proporcionam vantagens ao uso de fungicida sintético, reduzindo a possibilidade de resistência em fitopatógenos (LIMA *et al.*, 2019).

According to the literature, phenolic compounds such as citronellol, geraniol and nerol in the oil from *C. winterianus* (CRUZ *et al.*, 2015), eugenol, β -caryophyllene, α -humulene, caryophyllene oxide and eugenyl acetate in *S. aromaticum* (ROJAS *et al.*, 2014), eucalyptol or 1,8-cineole, α -pinene, o-cimene, limonene, γ -terpinene in *E. globulus* (MACEDO *et al.*, 2009) and δ -3-carene, limonene, α -pheelandrene and α -pinene in *S. terebinthifolius* (SANTOS *et al.*, 2007), are the main components in these oils associated with antimicrobial activity.

The effect of the studied oils inhibiting *C. theobromicola* is verified in Figure 1. The mechanism of action of the essential oils from *C. winterianus* are associated to modifications in the morphologic structures in microorganisms, promoting interactions with ergosterol from cell membranes, resulting in the disruption of cell membranes (OLIVEIRA *et al.*, 2015). The mechanisms from *S. aromaticum* oils are related to their hydrophobicity, which promotes interactions with cell walls and the lipids from the cell membrane and mitochondria, modifying cell permeability and causing disturbances on their structures (LIMA *et al.*, 2019). Regarding *S. terebinthifolius*, the mechanisms of action for its essential oils are associated with the inhibition of cell wall formation in fungi (ALVES *et al.*, 2013). The essential oils from *E. globulus* need further studies to completely define their mechanisms of action against microorganisms and fungi (BARBOSA *et al.*, 2016).

Figures 2A and 2D, show the efficiency of the studied oils to control the mycelial growth *in vitro* at different concentrations, with emphasis to *S. terebinthifolius* oils (55%) and *S. aromaticum* (49%). *In vitro* inhibition of fungal growth using different oils are reported in the literature. Cruz *et al.* (2015), while evaluating oils from *C. winterianus*, verified a reduction in mycelial growth in three isolates of *Fusarium solani* evaluated at increasing concentrations (5, 10, 15, 20, 25 and 30 $\mu\text{L mL}^{-1}$). Studying the control of fungal pathogens, Lima *et al.* (2019) reported total inhibition of the mycelial growth in *Fusarium verticillioides*, at low concentrations of *S. aromaticum* oils. In a similar manner, Arruda *et al.* (2019) reported total control of *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* using a concentration of 2.0 $\mu\text{L mL}^{-1}$ of *E. globulus* oils.

Evaluating anti-fungal activity of *S. terebinthifolius* oils, Mohamed *et al.* (2020) reported the inhibition of *Bipolaris oryzae*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani* and *R. solani* growth, with significant results at a dosage of 3%. In addition to evidence the anti-fungal potential from different essential oils, these studies suggest that the concentration required to inhibit mycelial growth *in vitro* will depend of the microorganism evaluated, validating the investigation of minimal concentrations required for different pathogens of economic importance.

De acordo com a literatura, compostos fenólicos, como o citronelol, geraniol e nerol no óleo de *C. winterianus* (CRUZ *et al.*, 2015), o eugenol, β -cariofileno, α -humuleno, óxido de cariofileno e acetato de eugenil no *S. aromaticum* (ROJAS *et al.*, 2014), eucaliptol ou 1,8-cineol, α -pineno, o-cimeno, limoneno, γ -terpineno no *E. globulus* (MACEDO *et al.*, 2009) e δ -3-careno, limoneno, α -felandreno e α -pineno na *S. terebinthifolius* (SANTOS *et al.*, 2007), são os constituintes majoritários presentes nesses óleos que comumente estão associados à atividade antimicrobiana.

Na Figura 1, verificou-se efeito dos óleos estudados sobre a inibição do *C. theobromicola*. O mecanismo de ação do óleo essencial de *C. winterianus* está associado a modificações nas estruturas morfológicas dos microorganismos, promovendo interação com o ergosterol da membrana, acarretando o rompimento da membrana celular (OLIVEIRA *et al.*, 2015). Para o óleo de *S. aromaticum*, o mecanismo de ação é relacionado à sua hidrofobicidade, que propicia interação com a parede e os lipídios da membrana celular e mitocôndrias, alterando a permeabilidade celular e ocasionando distúrbios em suas estruturas (LIMA *et al.*, 2019). Para o *S. terebinthifolius*, o mecanismo de ação está relacionado a inibição da formação da parede celular dos fungos (ALVES *et al.*, 2013). O óleo de *E. globulus* requer mais estudos para definir completamente o seu mecanismo de atividade antimicrobiana e antifúngica (BARBOSA *et al.*, 2016).

As Figuras 2A a 2D mostram a efetividade dos óleos estudados para o controle micelial do fungo *in vitro* em diferentes concentrações, sobressaindo-se os óleos *S. terebinthifolius* (55%) e *S. aromaticum* (49%). Resultados inibitórios no crescimento fúngico, usando diferentes óleos em condições *in vitro*, são reportados na literatura. Cruz *et al.* (2015), avaliando o óleo de *C. winterianus*, verificaram redução do crescimento micelial de três isolados de *Fusarium solani* em função do aumento das doses (5, 10, 15, 20, 25 e 30 $\mu\text{L mL}^{-1}$). Estudando o controle de alguns patógenos fúngicos, Lima *et al.* (2019) alcançaram inibição total do crescimento micelial de *Fusarium verticillioides* com baixas doses de *S. aromaticum*. Enquanto Arruda *et al.* (2019) atingiram o controle total de *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii* com a concentração 2,0 $\mu\text{L mL}^{-1}$ do óleo de *E. globulus*.

Avaliando a atividade antifúngica do óleo de *S. terebinthifolius*, Mohamed *et al.* (2020) conseguiram inibir o crescimento de *Bipolaris oryzae*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani* e *R. solani* com resultados mais promissores na dose de 3%. Além de comprovar o potencial antifúngico dos diferentes óleos essenciais, os resultados desses estudos sugerem que a concentração necessária para inibir o crescimento micelial em condições *in vitro* dependerá do microorganismo avaliado, justificando a investigação da concentração mínima em outros fitopatógenos de importância econômica.

The employment of essential oils from different vegetal species to control *C. theobromicola* was previously reported in the literature, with significant results regarding mycelial growth. Oliveira *et al.* (2019) reported a concentration of 200 $\mu\text{L mL}^{-1}$ of *Zingiber officinale* Roscoe essential oil, inhibited 69% of mycelial growth. Oliveira *et al.* (2019b), while evaluating the toxic effect from different essential oils against the mycelial growth in *C. theobromicola*, verified total inhibition using oils from *Piper marginatum* and *P. callosum* at a concentration of 1%.

With respect to the genus *Colletotrichum*, the control of some species using essential oils is registered in some studies. Ramos *et al.* (2016), while studying the control of *C. gloeosporioides*, verified that various oils showed anti-fungal activity at different concentrations varying from 0.8% (*Melaleuca alternifolia*), 3.2%, (*E. globulus*), 6.3% (*Citrus limon*, *Cymbopogon citratus*, *S. aromaticum*, *Cinnamomum verum* and *Azadirachta indica*), 12.5% (*Mentha spicata* and *C. winterianus*), 25% (*Copaifera langsdorffii*), 50% (*Cocos nucifera* and *Z. officinale*) to 100% (*Ocimum basilicum*). Cruz *et al.* (2017), while evaluating the anti-fungal activity of the essential oils from *Lippia gracilis*, attained 50% inhibition of mycelial growth in *C. acutatum* with the lowest concentration tested (0.15%).

The results in the present study signpost for management programs to control *Colletotrichum theobromicola* with the participation of Annonaceae's farmers in the Brazilian Northeastern region. The pathogen, as frequently reported, has caused the anthracnose disease in annona orchards. Innovative alternative strategies in management programs are extremely necessary due to the aggressiveness of this disease, which arises rapidly in crops causing significant losses for farmers, reducing production between 53 to 70% when extended rainfall periods are present during blooming and fruit formation stages (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 2014).

CONCLUSIONS

The essential oils studied showed anti-fungal activity, specifically inhibiting mycelial growth in *C. theobromicola*;

At the maximum dosage studied of 50 $\mu\text{L mL}^{-1}$, the highest control percentages were observed in essential oils from *S. terebinthifolius* (55%) and *S. aromaticum* (49%).

ACKNOWLEDGMENTS

The present study was supported by the Research Foundation from Alagoas State - FAPEAL. We are thankful to the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel - CAPES.

O uso de óleo essencial de outras espécies vegetais no controle de *C. theobromicola* foram relatados na literatura, com resultados significativos para a inibição micelial. Oliveira *et al.* (2019a) relataram que a concentração de 200 $\mu\text{L mL}^{-1}$ do óleo de *Zingiber officinale* Roscoe inibiu 69% do crescimento micelial do patógeno. Oliveira *et al.* (2019b), avaliando o efeito fungitóxico de diferentes óleos essenciais sobre o crescimento micelial de *C. theobromicola*, constataram inibição total do crescimento micelial nas espécies *Piper marginatum* e *P. callosum* na concentração de 1% dos óleos.

Em relação ao gênero *Colletotrichum*, o controle por meio de óleos essenciais é relatado em diversos estudos. Ramos *et al.* (2016), no controle *in vitro* de *C. gloeosporioides*, verificaram que os diversos óleos utilizados apresentaram atividade fungicida em diferentes concentrações, que variaram de 0,8% (*Melaleuca alternifolia*), 3,2%, (*E. globulus*), 6,3% (*Citrus limon*, *Cymbopogon citratus*, *S. aromaticum*, *Cinnamomum verum* e *Azadirachta indica*), 12,5% (*Mentha spicata* e *C. winterianus*), 25% (*Copaifera langsdorffii*), 50% (*Cocos nucifera* e *Z. officinale*) e 100% (*Ocimum basilicum*). Cruz *et al.* (2017), avaliando a atividade antifúngica de óleos essenciais de genótipos de *Lippia gracilis*, alcançaram com a menor concentração testada (0,15%) a inibição do crescimento micelial de *C. acutatum* em mais de 50%.

Os resultados deste estudo apontam para um plano de gerenciamento no controle de *Colletotrichum theobromicola* juntamente com os produtores de annonaceas na região Nordeste. Visto que o patógeno, conforme se relatou com maior frequência, tem causado a doença antracnose nos pomares de Annona. Estratégias alternativas inovadoras para se empregar no manejo são extremamente necessárias devido à agressividade com a qual a doença vem se instalando rapidamente nos plantios e causando prejuízos na produção, reduzindo a produção em 53 a 70% quando ocorrem chuvas prolongadas durante a floração e formação dos frutos (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 2014).

CONCLUSÕES

Os óleos estudados apresentam atividade antifúngica, especificamente na inibição micelial para *C. theobromicola*;

Na dose máxima estudada, 50 $\mu\text{L mL}^{-1}$ do óleo, os maiores controles se deram pelos óleos *S. terebinthifolius* (55%) e *S. aromaticum* (49%).

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi apoiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Alagoas - FAPEAL. Agradecemos também à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES.

CITED SCIENTIFIC LITERATURE

- ALVES, L. A.; FREIRES, I. A.; PEREIRA, T. M.; SOUZA, A.; LIMA, E. O.; CASTRO, R. D. Effect of *Schinus terebinthifolius* on *Candida albicans* growth kinetics, cell wall formation and micromorphology. **Journal Acta Odontologica Scandinavica**, v. 71, 2013. DOI: [HTTP://DX.DOI.ORG/10.3109/00016357.2012.741694](http://DX.DOI.ORG/10.3109/00016357.2012.741694).
- ARRUDA, E. L.; LOPES, M. B. S.; JÚNIOR, A. F. C.; FIDELIS, R. R.; SANTOS, M. M. Atividade antifúngica de negramina, eucalipto e pinhão manso sobre os fitopatógenos. **Applied Research & Agrotechnology**, v. 12, n. 2, p. 47-58, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.5935/PAET.V12.N2.04>.
- BALLESTE, V. M.; MANTELLI, J. Presença de resíduos de agrotóxicos nos alimentos: um enfoque no pimentão e pepino. **Revista Geografia em Atos**, v. 2, n. 17, p. 44-63, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.35416/geoatos.v2i17.6480>.
- BARBOSA, L. C. A.; FILOMENO, C. A.; TEIXEIRA, R. R. Chemical Variability and Biological Activities of *Eucalyptus* spp. Essential Oils. **Molecules**, v. 21, p. 1671, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules21121671>.
- BRZEZINSKA, M. S.; JANKIEWICZ, U.; BURKOWSKA, A.; WALCZAK, M. Chitinolytic microorganisms and their possible application in environmental protection. **Current Microbiology**, v. 68, p. 71–81, 2014. DOI: [HTTP://DX.DOI.ORG/10.1007/s00284-013-0440-4](http://DX.DOI.ORG/10.1007/s00284-013-0440-4).
- COSTA, J. F. O.; KAMEI, S. H.; SILVA, J. R. A.; MIRANDA, A. R. G. S.; NETTO, M. B.; SILVA, S. J. C.; CORREIA, K. C.; LIMA, G. S. A.; ASSUNÇÃO, I. P. Species diversity of *Colletotrichum* infecting *Annona* spp. in Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, v. 153, p. 169-180, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10658-018-01630-w>.
- CRUZ, E. M. O.; ALVES, M. F.; MENDONÇA, M. C.; SAMPAIO, T. S.; LUZ, J. M. Q.; BLANK, A. F. Atividade antifúngica da emulsão e do óleo essencial de genótipos de *Lippia gracilis* sobre *Colletotrichum acutatum*. **Revista RG News**, v. 3, n. 2, 2017.
- CRUZ, T. P.; ALVES, F. R.; MENDONÇA, R. F.; COSTA, A. V.; JUNIOR, W. C. J.; PINHEIRO, P. F.; MARINS, A. K. Atividade fungicida do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* Jowit (citronela) contra *Fusarium solani*. **Bioscience Journal**, v. 31, n. 1, p. 1-8, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.14393/BJ-v31n1a2015-22346>.
- DEAN, R.; KAN, J. A. L. V.; PRETORIUS, Z. A.; KOSACK, K. E. H.; PIETRO, A.; SPANU, P. D.; RUDD, J. J.; DICKMAN, M.; KAHMANN, R.; ELLIS, J.; FOSTER, G. D. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, v. 13, n. 4, p. 414-430, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>.
- GHINI, R.; HAMADA, E.; BETTIOL, W. **Impactos das mudanças climáticas sobre doenças de importantes culturas no Brasil**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 356 p., 2011.
- JUNQUEIRA, N. T. V.; JUNQUEIRA, K. P. Principais doenças de anonáceas no Brasil: Descrição e Controle. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, edição especial, p. 55-64, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452014000500006>.
- KIMATI, H.; AMORIM, L.; FILHO, A. B.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. **Manual de Fitopatologia**. Agronômica Ceres, São Paulo, 2011. 704p.
- LIMA, T. S.; FRANÇA, K. R. S.; AZEVEDO, P. T. M.; PAIVA, Y. F.; SILVA, J. C. S.; SILVA, K. O.; SANTOS, A. B.; GALDINO, J. A. A. S.; JÚNIOR, A. F. M.; CARDOSO, T. A. L. Control of Some Phytopathogenic Fungi Using Clove Essential Oil (*Syzygium aromaticum* L.). **Journal of Experimental Agriculture International**, v. 39, n. 3, p. 1-11, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.9734/jeai/2019/v39i330332>.
- MACEDO, I. T. F.; BEVILAQUA, C. M. L.; OLIVEIRA, L. M. B.; VASCONCELOS, A. L. F. C.; VIEIRA, L. S.; OLIVEIRA, F. R.; JUNIOR, E. Q.; PORTELA, B. G.; BARROS, R. S.; CHAGAS, A. C. S. Atividade ovicida e larvicida *in vitro* do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* sobre *Haemonchus contortus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 3, p. 62-66, 2009. DOI: <http://dx.doi.org/10.4322/rbpv.01803011>.

- MOHAMED, A. A.; BEHIRY, S. I.; ALI, H. M.; HEFNY, M.; SALEM, M. Z. M.; ASHMAWY, N. A. Phytochemical Compounds of Branches from *Pinus halepensis* Oily Liquid Extract and *Schinus terebinthifolius* Essential Oil and Their Potential Antifungal Activity. **Processes**, v. 8, n. 330, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/pr8030330>.
- MUNHUWEYI, K.; LENNOX, C. L.; HOPKINS, J. C. M.; CALEB, O. J.; OPARA, U. L. Major diseases of pomegranate (*Punica granatum* L.), their causes and management. **Scientia Horticulturae**, v. 211, p. 126-139, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2016.08.016>.
- OLIVEIRA, S. S.; HANADA, R. E.; BRITO, R. S. Composição química e atividade antifúngica do óleo essencial de *Zingiber officinale* Roscoe sobre *Colletotrichum theobromicola*, causador da antracnose da cebolinha (*Allium fistulosum*). **Scientia Naturalis**, v. 1, n. 1, p. 32-40, 2019a.
- OLIVEIRA, S. S.; HANADA, R. E.; CHAVES, F. C. M.; NASCIMENTO, G. O.; ASSIS, L. A. G.; OLIVEIRA, S. S.; OLIVEIRA, M. R. Fungitoxicidade de óleos essenciais de *Piper* spp. sobre *Colletotrichum theobromicola*. Editora INPA- **Diversidade Microbiana da Amazônia**, v. 3, p. 29-33, 2019b.
- OLIVEIRA, W. A.; ARRUA, J. M. M.; WANDERLEY, P. A.; LIMA, R. B.; LIMA, E. O. Effects of the essential oil of *Cymbopogon winterianus* against *Candida albicans*. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 6, n. 3, p. 21-26, 2015.
- PEREIRA, M. C.; VILELA, G. R.; COSTA, L. M. A. S.; SILVA, R. F.; FERNANDES, A. F.; FONSECA, E. W. N.; PICOLLI, R. H. Inibição do desenvolvimento fúngico através da utilização de óleos essenciais de condimentos. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 4, p. 731-738, 2006.
- PERINA, F. J.; AMARAL, D. C.; FERNANDES, R. S.; LABORY, C. R. G.; TEIXEIRA, G. A.; ALVES, E. *Thymus vulgaris* essential oil and thymol against *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler: effects on growth, viability, early infection and cellular mode of action. **Pest Management Science**, v. 71, n. 10, p. 1371-1378, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/ps.3933>.
- RAMOS, K.; JUNIOR, R. A.; KOZUSNY, D. I. A. Óleos essenciais e vegetais no controle *in vitro* de *Colletotrichum gloeosporioides*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 2, p. 605-612, 2016. DOI: http://dx.doi.org/10.1590/1983-084x/15_192.
- RAUT, J. S.; KARUPPAYIL, S. M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 250-264, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.05.055>.
- RODRIGUES, A. L.; PINHO, D. B.; LISBOA, D. O.; NASCIMENTO, R. J.; PEREIRA, O. L.; ALFENAS, A. C.; FURTADO, G. Q. *Colletotrichum theobromicola* causes defoliation, stem girdling and death of mini-cuttings of eucalyptus in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 39, p. 326-330, 2014.
- ROJAS, D. F. C.; SOUZA, C. R. F.; OLIVEIRA, W. P. Clove (*Syzygium aromaticum*): A precious spice. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 4, p. 90-96, 2014. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S2221-1691\(14\)60215-X](http://dx.doi.org/10.1016/S2221-1691(14)60215-X).
- SANTOS, A. C. A.; ROSSATO, M.; AGOSTTINI, F.; SANTOS, P. L.; SERAFINI, L. A.; MOYNA, P.; DELLACASSA, E. Avaliação química mensal de três exemplares de *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 2, p. 1011-1013, 2007.
- SHEAHAN, M.; BARRETT, C. B.; GOLDVALE, C. Human health and pesticide use in Sub-Saharan Africa. **Agricultural Economics**, v. 48, n. 51, p. 27-41, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/agec.12384>.
- SILVA, E. K. C.; MELO, L. G. L. Manejo de doenças de plantas: Um enfoque agroecológico. **Revista EDUCAMazônia-Educação Sociedade e Meio Ambiente**, v. 10, n. 1, p. 143-157, 2013.
- TAKESHITA, V.; OLIVEIRA, F. F.; WITT, F. A. P.; RIBEIRO, L. F. C. Efeito inibitório de extratos vegetais da Família *Allioideae* sobre *Guignardia citricarpa* - agente causal da mancha preta em *citrus*. **Enciclopédia Biosfera**, v. 10, n. 19, p. 906-919, 2014.
- WEIR, B. S.; JOHNSTON, P. R.; DAMM, U. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. **Studies in Mycology**, v. 73, p. 115-180, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.3114/sim0011>.