



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL
DE PERNAMBUCO**
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM FITOPATOLOGIA**

Tese de Doutorado

Controle biológico e alternativo da antracnose do pimentão

Emmanuelle Rodrigues Araújo

**Recife – PE
2013**

EMMANUELLE RODRIGUES ARAÚJO

CONTROLE BIOLÓGICO E ALTERNATIVO DA ANTRACNOSE DO PIMENTÃO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Fitopatologia.

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

Orientador: Delson Laranjeira

Co-orientador: Wolfgang Harand

RECIFE-PE

2013

Ficha catalográfica

A663c Araújo, Emmanuelle Rodrigues
Controle biológico e alternativo da antracnose do pimentão
/ Emmanuelle Rodrigues Araújo. -- Recife, 2013.
88 f. : il.

Orientador: Delson Laranjeira.
Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade
Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia,
Recife, 2013.

Referência.

1. *Colletotrichum scovillei* 2. Antracnose 3. *Capsicum
annuum*. 4. Leveduras biocontroladoras 5. Extratos vegetais
6. Fitopatologia I. Laranjeira, Delson, orientador II. Título


CDD 632

CONTROLE BIOLÓGICO E ALTERNATIVO DA ANTRACNOSE DO PIMENTÃO

EMMANUELLE RODRIGUES ARAÚJO

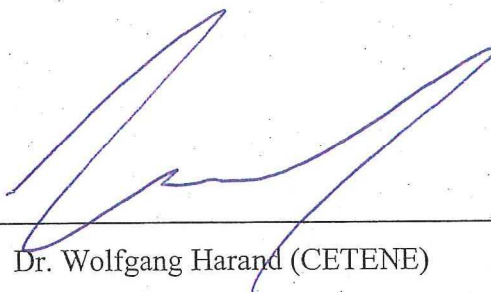
Tese defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 31/07/2013

ORIENTADOR:

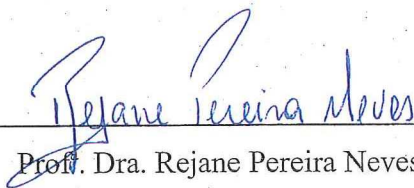


Prof. Dr. Delson Laranjeira

EXAMINADORES:



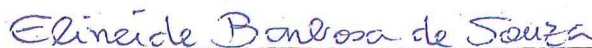
Dr. Wolfgang Harand (CETENE)



Prof. Dra. Rejane Pereira Neves (UFPE)



Dra. Rejane Rodrigues da Costa e Carvalho (UFRPE)



Prof. Dra. Elineide Barbosa de Souza (UFRPE)

“...aprender não é um ato findo. Aprender é um exercício constante de renovação...”

“O conhecimento exige uma presença curiosa do sujeito em face do mundo. Requer uma ação transformadora sobre a realidade. Demanda uma busca constante. Implica em invenção e em reinvenção”.

(Paulo Freire)

Dedicatória

Dedico esta tese, bem como minhas demais conquistas, aos meus pais Emanuel e Germana, que sempre se doaram por inteiro, muitas vezes renunciando de seus sonhos, para que pudesse realizar os meus. Por serem verdadeiros exemplos de vida, força, caráter, dignidade e sabedoria. Que sempre me guiaram e ensinaram a ser uma pessoa justa, amiga e compreensiva nas várias instâncias da vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela saúde, sabedoria, pela força interior que me deu para superar as dificuldades, por ter me mostrado o caminho nas horas mais incertas e me ajudado a concluir esta importante etapa de minha vida.

Aos meus pais Emanuel e Germana meu alicerce, inspiração de bondade, amizade e respeito.

Ao meu marido Leonardo, pelo amor, respeito e compreensão em todos os momentos dessa caminhada, que me fizeram amadurecer e ser mais feliz.

Aos meus irmãos Eder, Eveline e Eduardo que me ajudaram nas diversas ocasiões de angústia e por serem mais que irmãos, verdadeiros amigos.

Aos meus familiares de uma forma geral, em especial a Tia Iara pelo apoio e carinho demonstrados ao longo dessa caminhada.

A meu orientador Prof. Dr. Delson Laranjeira, pelos ensinamentos, direcionamentos, paciência, disponibilidade e horas cedidas ao meu aprendizado.

Ao meu co-orientador Wolfgang Harand, por sua ajuda nos momentos mais críticos, por acreditar no futuro deste projeto, por sua contribuição para o meu crescimento profissional e por ser também um exemplo a ser seguido.

À Dra. Rejane Pereira Neves, do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco, pela presteza em todos os momentos e pela identificação das leveduras do presente trabalho.

À Dra. Elsie Franklin Guimaraes, do Herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro-RJ, pela disponibilidade em confirmar identificação botânica da espécie vegetal utilizada neste estudo.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco, pelo apoio Institucional e ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, e seus professores pelo ensino e dedicação para minha formação de Doutora em Fitopatologia.

Aos funcionários da área de Fitossanidade, Romildo, Darcy e em especial ao Sr. Luiz Coelho por sua disponibilidade e apoio nos experimentos realizados em casa de vegetação.

Aos amigos do Laboratório de Fungos de Solos: Geane, Gisely, Adelmo e Cristina em especial a Iwanne, Rejane e Viviane pela amizade, pelas palavras de conforto nos desabafos, comemorações nas vitórias e ajuda nos mais diversos momentos.

Aos amigos do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Cristiane, Dyane, Christianno, Edilaine, Bárbara, Nelson e Marília.

À família formada pelas amigas do LAFIP – CETENE, Lili, Josy, Aldenise, Andreza, Issac em especial a Fernanda, Joana e Roberta, pela amizade construída, respeito e companheirismo que tonaram as horas de trabalho mais prazerosas.

À Pollyana Karla, Juliana Pereira, Karoline Diniz, minhas amigas, que sempre souberam me escutar, apoiar nas horas boas e ruins e que levo em meu coração para toda a vida.

À amiga e ex-orientadora, Dra. Elizanilda Ramalho do Rêgo (UFPB), pelo auxílio às questões estatísticas.

À meu eterno orientador Ivan Coelho Dantas (in memoriam) pelos ensinamentos e amizade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pelo financiamento da bolsa de estudos.

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS	vi
SUMÁRIO.....	vii
RESUMO GERAL.....	viii
GENERAL ABSTRACT.....	ix
CAPÍTULO I – Introdução Geral	10
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27
CAPÍTULO II - Biocontrol of bell peppers anthracnose using yeasts	47
Abstract.....	48
Introduction	48
Material and methods	49
Results	53
Discussion.....	54
Acknowledgments	57
References	57
CAPÍTULO III – Extratos vegetais de capeba e nim no controle de <i>Colletotrichum</i> <i>scovillei</i>	68
Resumo	69
Abstract.....	69
Introdução.....	70
Material e métodos	72
Resultados e discussão	75
Conclusões.....	78
Agradecimentos	78
Referências	79
Conclusões Gerais	86

RESUMO GERAL

O pimentão (*Capsicum annuum*) é uma das mais importantes hortaliças cultivadas no Brasil. Dentre as doenças que acometem esta cultura, a antracnose é considerada uma das mais importantes, a nível mundial, sendo ocasionada *Colletotrichum* spp. Atualmente têm-se intensificado a busca por métodos alternativos de controle de doenças de plantas através do uso de agentes biocontroladores e extratos vegetais, por serem métodos mais seguros, eficientes, econômicos e que não serem poluentes. Os objetivos deste trabalho foram: isolar leveduras de frutos de pimentão; avaliar a patogenicidade de isolados de *Colletotrichum* spp. provenientes de pimentão e indicar o mais agressivo; avaliar o fator *killer* das leveduras e *in vivo* e *in vitro* e o uso destas como biocontroladoras comparando este efeito com a utilização do fungicida mancozeb no controle da antracnose do pimentão; investigar o uso de extratos vegetais de *Piper marginatum* e *Azadirachta indica* no controle da antracnose. O isolado fitopatogênico foi confirmado como *Colletotrichum scovillei*. As leveduras *Rhodotorula mucilaginosa* L6, *Candida duobushaemulonii* sp. nov. L15 e *Candida natalensis* CG27 reduziram o tamanho da lesão, porcentagem de inibição do tamanho da lesão em pós-colheita de frutos de pimentão e crescimento micelial *in vitro* de *Colletotrichum scovillei*. Em pré-colheita, *C. natalensis* foi a espécie mais eficiente nos três períodos avaliados (7, 14 e 21 dias). As leveduras utilizadas foram eficientes em inibir o crescimento micelial de *C. scovillei* *in vitro* através da produção de compostos voláteis. *R. mucilaginosa* produziu toxina *Killer*. O extrato metanólico de *P. marginatum* nas concentrações de 1000 e 2000 ppm foram eficientes no controle de *Colletotrichum scovillei* *in vitro*. Apenas o extrato hexânico de *P. marginatum* a 2000 ppm foi eficiente no controle do fitopatógeno. Em fracionamento de extrato metanólico de *P. marginatum*, a fração acetato de etila em quantidades infimamente menores que as demais frações, controlou *C. scovillei* *in vitro*. O composto 12 demonstrou atividade antifúngica a *Colletotrichum scovillei* *in vitro* e em pós-colheita e foi mais eficiente que o fungicida mancozeb no controle *in vitro* e pós-colheita de *C. scovillei*. O uso de leveduras e extratos de *Piper marginatum* mostraram-se eficazes no controle da antracnose do pimentão ocasionada por *Colletotrichum scovillei*, mostrando-se uma alternativa promissora para a busca de formulações para uso no campo e na pós-colheita.

Palavras-Chave: *Colletotrichum scovillei* Damm, *Piper marginatum* Jacq., *Azadirachta indica* A. Juss, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Candida duobushaemulonii* sp. nov., *Candida natalensis*.

GENERAL ABSTRACT

The bell pepper (*Capsicum annuum* L.) is one of the most important vegetable crops cultivated in Brazil. Among the diseases affecting this crop, anthracnose is considered one of the most important in the world, being caused *Colletotrichum* spp. Currently have intensified the search for alternative methods of controlling plant diseases through the use of biocontrol agents and plant extracts, because this method is secure, efficient, economic and are not pollutants. The goals of this work were to isolate yeast bell pepper fruits; evaluate the pathogenicity of *Colletotrichum* spp. from bell pepper and indicate the most aggressive; evaluate the *Killer* factor of yeasts and *in vivo* and *in vitro*, and use these as biocontrol comparing them with the use of mancozeb fungicide in controlling anthracnose of bell pepper; investigate the use of plant extracts of *Piper marginatum* and *Azadirachta indica* in controlling anthracnose. The isolate was confirmed as pathogenic *Colletotrichum scovillei*. The yeast *Rhodotorula mucilaginosa* L6, *Candida duobushaemulonii* sp. nov. L15 and *Candida natalensis* CG27 reduced lesion size, percentage inhibition of lesion size in post-harvest bell pepper fruit and mycelial growth of *Colletotrichum scovillei*. In pre-harvest, *C. natalensis* was the most efficient species during the three periods (7, 14 and 21 days). The yeasts were effective in inhibiting the mycelial growth of *C. scovillei* *in vitro* by producing volatile compounds. The yeast *R. mucilaginosa* produced *Killer* toxin. The methanol extract of *P. marginatum* at 1000 and 2000 ppm concentrations were effective in controlling *Colletotrichum scovillei* *in vitro*. Only hexane extract of *P. marginatum* to 2000 ppm was effective in controlling this pathogen. On fractionation of the methanol extract of *P. marginatum*, the ethyl acetate fraction in amounts vanishingly smaller than the other fractions, controlled *C. scovillei* *in vitro*. Compound 12 showed antifungal activity to *Colletotrichum scovillei* *in vitro* and in post-harvest and was more efficient than the mancozeb fungicide *in vitro* and in control postharvest *C. scovillei*. The use of yeast and *Piper marginatum* extracts and compounds were effective in controlling anthracnose caused by *Colletotrichum scovillei* in bell pepper, being a promising alternative to the search for formulations for use in the field and after harvest.

Keywords: *Colletotrichum scovillei* Damm, *Piper marginatum* Jacq., *Azadirachta indica* A. Juss, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Candida duobushaemulonii* sp. nov., *Candida natalensis*.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL

CONTROLE BIOLÓGICO E ALTERNATIVO DA ANTRACNOSE DO PIMENTÃO

INTRODUÇÃO GERAL

Importância sócio-econômica do pimentão

O gênero *Capsicum* abrange espécies da família Solanaceae conhecidas como pimentões e pimentas. É nativo do continente americano, sendo o México e a América Central as regiões que fazem parte dos grandes centros de diversidade da cultura, sendo as espécies cultivadas desde, aproximadamente, 7000 anos a.C. (BIANCHETTI, 1996; CASALI; COUTO, 1984; DE WITT; BOSLAND, 1993).

O pimentão (*Capsicum annuum* L.) apresenta extensa diversidade, expressa em diferentes formas, sabores, bem como uma grande variedade de cores, o que demonstra ampla variabilidade genética. É uma planta de clima tropical, desenvolve-se e produz mais em temperaturas relativamente elevadas ou amenas, sendo intolerante a baixas temperaturas e a geadas (FILGUEIRA, 2005).

É uma das mais importantes hortaliças cultivadas no Brasil, o pimentão vem apresentando expressivo crescimento. A produção nacional que era de 190.000 t em 1993 (HAMMERSCHIMIDT, 1993) passou para 248.767 t em 2006, obtendo destaque a região Sudeste com 120.773 t, seguida da região Nordeste com 77.795 t (IBGE, 2006). No Nordeste, os estados do Ceará, Bahia e Pernambuco foram os maiores produtores de pimentão, com respectivamente 24.465, 20.980 e 13.960 t (IBGE, 2006; CEASA-PE, 2005).

No Estado de Pernambuco, os municípios de Camocim de São Félix, Bezerros, Gravatá, São Joaquim do Monte, Chã Grande, Sairé, João Alfredo, Brejo da Madre de Deus e Ibimirim são os principais fornecedores de pimentão da cidade do Recife (CEASA-PE, 2011).

Dentre as Solanáceas, o pimentão perde apenas para o tomate (*Solanum lycopersicon* L.) e a batata inglesa (*Solanum tuberosum* L.) com relação a área cultivada e quantidade produzida (IBGE, 2006). Estima-se que a área cultivada anualmente no Brasil é em torno de 13 mil hectares, com produção próxima a 290 mil toneladas de frutos (MAROUELLI; SILVA, 2012).

Os frutos de pimentão são consumidos no ponto de maturação comercial, além de serem utilizados na indústria alimentícia para produção de pigmentos (REIFSCHNEIDER; RIBEIRO, 2004). Devido ao aumento do consumo *in natura*, bem como do processamento de molhos, temperos e conservas, a importância da cultura do pimentão vem crescendo a cada

dia no Brasil, e em outros países, como Estados Unidos, México, Itália, Japão e Índia (AZEVEDO et al., 2006).

Apesar da procura cada vez maior no mercado, são os consumidores que determinam os tipos de pimentão a serem cultivados. As variedades mais conhecidas são o verde, o amarelo e o vermelho, que são fontes de vitamina A e C, cálcio, fósforo, ferro e sódio, e possui baixas calorias (ABH, 2007). Há mercados que preferem pimentões pequenos, nesse caso a opção seria o plantio de pimentões do tipo curtos, muito comuns nas regiões Norte e Nordeste do país, entretanto os cônicos são responsáveis pela mais importante área de cultivo. O cultivo pode ser campo aberto ou em estufas, sendo o cultivo em campo aberto o que ocupa a maior área no Brasil, enquanto ao cultivo em estufas cabe a produção de frutos a serem comercializados maduros e de coloração vermelha, amarela ou lilás (MALDONADO, 2001).

Doenças do pimentão

A cultura do pimentão pode ser acometida por uma série de fitopatógenos que acarretam danos econômicos. Dentre estes, podem ser citados: *Colletotrichum* spp. (antracnose) (VIANA et al., 2007), *Phytophthora* spp. (murcha-de-fitóftora ou requeima), *Xanthomonas* sp. (pústula ou mancha-bacteriana), *Ralstonia solanacearum* (Smith, 1896) Yabuuchi et al. (1995) (murcha bacteriana).

Apesar dos prejuízos causados por todos os patógenos mencionados, uma das doenças mais limitantes do sistema de produção de pimentões é a antracnose, a qual é caracterizada por lesões necróticas profundas e delimitada nos tecidos (BAILEY; JEGER, 1992). A doença é favorecida pela suscetibilidade do hospedeiro bem como as condições climáticas, como alta temperatura e umidade. A antracnose é considerada um grave problema a cultura, por atingir todos os estágios de desenvolvimento da planta, desde mudas em viveiros até a pós-colheita dos frutos. Nos frutos as lesões circulares geralmente apresentam coloração alaranjada, que corresponde a uma massa de conídios produzidos juntos a uma mucilagem solúvel em água, o que torna a mais destrutiva em períodos de chuva e alta umidade (VIANA et al., 2007). Em sementeiras ocorre o tombamento das plântulas; em folhas, manchas circulares escuras e necrose no caule.

Quanto aos aspectos epidemiológicos, temperaturas variando entre 20 a 25° C e alta umidade relativa do ar torna a antracnose uma das mais importantes doenças dessa hortaliça. O fungo *Colletotrichum* spp. pode ser disseminado pela água da chuva e vento, transmitido por sementes e sobrevivendo em restos culturais.

Mundialmente falando, a antracnose é considerada uma das mais importantes doenças do pimentão (CHANG; CHUNG, 1985; MANANDHAR et al., 1995; PARK; KIM, 1992; PAKDEEVARAPORN et al., 2005; SHARMA et al., 2005; SHIN et al., 1999; MARVEL, 2003; VOORRIPS et al., 2004; YOON; PARK, 2001).

A antracnose do pimentão pode ser causada por várias espécies de fungos do gênero *Colletotrichum*, tais como *C. gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc, *C. capsici* (Syd.) E.J. Butler & Bisby (1931), *C. acutatum* J.H. Simmonds (1968), *C. dematium* (Persoon) Grove e *C. coccodes* (Wallroth) Hughes. Entretanto, os relatos no Brasil indicam que *Colletotrichum gloeosporioides* é o principal agente causal da doença, com raros registros de demais espécies (AZEVEDO et al., 2006; KOIKE et al., 2006; MENDES et al., 1998). Recentemente, verificou-se que muitas espécies anteriormente descritas como *C. acutatum* faziam parte de um grande grupo semelhante morfológicamente, porém quando analisados com parâmetros moleculares verificou-se que se tratava de espécies distintas. Deste complexo, uma nova espécie foi classificada, ocasionando antracnose em *Capsicum*, denominada *Colletotrichum scovillei*, sendo relatada pela primeira vez na Tailândia e Indonésia (DAMM, 2012).

O gênero *Colletotrichum* é classificado como fungo imperfeito pertencente à ordem *Melanconiales* da classe *Coelomycetes*, os quais apresentam associação teleomórfica com ascomicetos do gênero *Glomerella* (SUTTON, 1980) Alguns caracteres morfológicos identificam este gênero, como conidiomata acervular, frequentemente com setas, as quais apresentam hifas estéreis de coloração escura, não ramificada e com parede espessa; presença do apressório através do aumento do volume com paredes espessas na extremidade do tubo da hifa ou do peg, para unir o fungo à superfície do hospedeiro antes da penetração do tecido. A reprodução sexual é via esporos endógenos (ascosporos), originados no interior de ascos e agamicamente por esporos formados sobre ramificações do micélio (conidióforos) ou no interior de corpos frutíferos denominados acérvulos. Os conídios nos acérvulos estão envolvidos por uma matriz mucilaginosa constituída de polissacarídeos e proteínas solúveis em água, que os protegem da dissecação e aumenta a eficiência de germinação e penetração no tecido hospedeiro (PERFECT et al., 1999).

É considerado um dos principais patógenos a nível mundial, além de incluir espécies saprofitas, reconhecidamente cosmopolita, ocorrendo em diversas espécies de hospedeiros, desde plantas medicinais a culturas agrícolas, arbustos e árvores silvestres; bem como causa uma gama de sintomas, tais como podridões em colmos, caules e frutos; seca de ponteiros; manchas foliares; infecções latentes; e antracnoses.

As sementes constituem-se na fonte de inóculo responsável pela introdução do patógeno em áreas indenens (KUROZAWA et al., 2005). O patógeno pode persistir em hospedeiros alternativos, especialmente em plantas da mesma família botânica do pimentão (tomate, batata, berinjela e jiló), bem como em plantas cultivadas e invasoras.

O inóculo se dissemina através de respingos de água de chuva ou de irrigação por aspersão, associados ao vento.

Identificação morfológica e molecular de *Colletotrichum* spp.

A identificação correta de espécies de *Colletotrichum* é de fundamental importância para o manejo adequado das diversas doenças causadas por esse grupo de patógenos (MILLS et al., 1992).

Apesar da identificação poder ser realizada através da análise morfológica, condições ambientais distintas podem gerar variabilidade dentro da mesma espécie (como por exemplo, modificação na forma e tamanho de conídios e apressórios, presença ou ausência e forma de setas, entre outros) (MILLS et al., 1992; SUTTON, 1992; WALLER, 1992).

Em diversos casos, encontra-se uma grande variabilidade entre isolados identificados dentro da mesma espécie (LOPEZ, 2001). Para se evitar erros na identificação de espécies de *Colletotrichum* podem ser realizadas análises em nível de genoma, através de técnicas moleculares (ANDRADE, 2003; BERNSTEIN et al., 1995; FREEMAN; RODRIGUEZ, 1995; FREEMAN; KATAN, 1997; FREEMAN et al., 1998; LOPEZ, 2001; TOZZE JÚNIOR. et al., 2004; TOZZE JÚNIOR. et al., 2006).

Alguns estudos visando caracterização de espécies de *Colletotrichum* divergem em seus resultados, quando contrastados parâmetros morfológicos e moleculares. Tozze Júnior (2007) ao caracterizar isolados de *Colletotrichum* provenientes de pimentão, verificou que estes eram morfológicamente semelhantes a *C. gloeosporioides*, porém, quando avaliados por PCR, constatou que se tratava de *C. acutatum*. Analisando isolados de *Colletotrichum*, provenientes de pimentão, pimenta e jiló, Bueno (2005), observou que os isolados apresentavam características de *C. gloeosporioides* enquanto que a identificação molecular revelava serem *C. acutatum*.

Diante do exposto, verifica-se que existe uma falta de consistência das características morfológicas na diferenciação entre espécies de *Colletotrichum*, sendo fundamental a utilização de técnicas moleculares para identificação deste gênero.

Controle da antracnose do pimentão

Algumas medidas integradas são recomendadas para o controle da antracnose do pimentão, dentre elas, destacam-se a escolha da área de plantio com boa drenagem; utilização de sementes saudáveis, realizando-se tratamentos prévios com fungicidas ou tratamento térmico com água a 52° C por 30 minutos; redução do adensamento no plantio, aumentando assim a aeração entre as plantas; adubação equilibrada, sem excesso de nitrogênio; plantio em épocas secas, desfavorecendo assim o patógeno; evitar irrigação por aspersão, pois favorece a disseminação do patógeno na área, dando preferência ao sistema de gotejamento; coleta e destruição de restos culturais; pulverização preventiva com fungicidas registrados para a cultura desde o início da frutificação; evitar plantio de outras espécies hospedeiras, como por exemplo, tomate, batata, berinjela, jiló e cucurbitáceas como culturas para rotação; controlar plantas daninhas, pois podem ser hospedeiras do fungo, por este ser um fungo cosmopolita; embalar os frutos colhidos, apenas, quando estiverem secos; expor os frutos para comercialização em locais arejados (CERKAUSKAS, 2004; KOIKE et al. 2006; LOPES; ÁVILA, 2003; MONTEIRO, 2000). Inexistem cultivares e híbridos comerciais de pimentão com bons níveis de resistência a antracnose em nível mundial (PARK, 2005).

Apesar de todas as recomendações mencionadas, a aplicação de produtos químicos continua sendo a tecnologia mais utilizada no controle da antracnose do pimentão no Brasil. Existem alguns produtos registrados para esta cultura, como é o caso de produtos a base de clorotalonil, mancozeb, azoxistrobina e cobre (AZEVEDO et al., 2006; FERNANDES et al., 2002). Entretanto, de acordo com Ghini e Kimati (2000), o grande problema do emprego de fungicidas no controle de doenças de plantas, é o surgimento de estirpes de fungos fitopatogênicos resistentes. Além deste, ainda existem muitos outros danos, como a contaminação de alimentos e do ambiente, intoxicação do homem e animais, aumento dos custos, perdas em larga escala (AZEVEDO, 2003).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária, através do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos, monitorou dezoito alimentos, no ano de 2010: abacaxi, alface, arroz, batata, beterraba, cebola, cenoura, couve, feijão, laranja, maçã, mamão, manga, morango, pepino, pimentão, repolho e tomate. Verificou-se que o pimentão foi o alimento que apresentou maiores níveis, aproximadamente 92% de resíduos de agrotóxicos (ANVISA, 2010).

Pensando nestes índices cada vez maiores de produtos químicos que estão sendo lançados tanto no ambiente, como entrando diretamente em contato com o homem, algumas medidas de controle alternativas devem ser utilizadas, visando o controle dos fitopatógenos.

Com base na necessidade da utilização de métodos mais seguros, eficientes, econômicos e que não sejam poluentes têm-se estimulado e intensificado a busca por métodos alternativos de controle de doenças de plantas cultivadas por meio do uso de extratos vegetais e controle biológico (STANGARLIN et al., 1999).

Neste contexto, a exploração e investigação de plantas, animais e micro-organismos a fim de identificar princípios ativos e ou enzimas úteis em diferentes áreas como na agronomia, indústria farmacêutica e alimentícia entre outras vem sendo também definida como estudo da diversidade biológica com fins econômicos e sociais (STROBEL; DAISY, 2003).

Utilização de leveduras no controle biológico

Controle biológico é entendido como a redução da soma de inóculo ou das atividades determinantes da doença provocadas por um patógeno, realizada por ou através de um ou mais organismos que não o homem (COOK; BAKER, 1983). Estes autores enfatizam que o foco do controle biológico não é o patógeno, e sim a supressividade da doença. O controle biológico é utilizado, principalmente, com o significado de controle de um patógeno por um antagonista. Em relação ao controle biológico, antagonista pode ser definido como um agente biológico com potencial para interferir nos processos vitais de fitopatógenos (MARIANO et al., 2002).

Os micro-organismos apresentam propriedades de conferir proteção às plantas, seja endofiticamente ou epifiticamente, contribuindo para a redução das perdas causadas pelas doenças de plantas na agricultura (MELO, 1998).

Dentre os micro-organismos (antagonistas) utilizados para o controle, em especial ao controle de fungos fitopatogênicos, têm-se dado preferência às leveduras, especialmente quando o objetivo dos trabalhos é a proteção de frutos destinados ao consumo *in natura*. A justificativa desta escolha relaciona-se ao fato desses micro-organismos terem sua ação antagônica vinculada mais à competição que à antibiose. Assim, considera-se que as leveduras não são, geralmente, produtoras de antibióticos, elementos considerados contaminantes químicos dos vegetais (SANHUEZA, 2000).

As leveduras constituem um grupo de micro-organismos unicelulares pertencentes ao Reino Fungi que se reproduzem assexuadamente por brotamento ou por fissão binária. Possuem núcleo organizado com membrana nuclear (célula eucariótica), são aclorofiladas, a nutrição é heterotrófica através de absorção de nutrientes, a parede celular é rígida e podem produzir esporos que são células especializadas. Mas ao contrário dos fungos filamentosos, elas não formam corpos de frutificação (KURTZMAN; FELL, 1998). Apresentam uma

relação grande com os basidiomicetos e com os ascomicetos, devido à produção de esporos e por isso são encontradas em seus respectivos filos. Podem também ser encontradas entre os fungos mitospóricos, que são aqueles sem reprodução sexuada conhecida, constituindo um grupamento artificial (HAWKSWORTH, et al. 1995).

As leveduras têm ampla distribuição na natureza. Podendo ser encontradas em solos sem cobertura vegetal ou em solos com vegetação natural (campos, matos e florestas) ou em cultivados (parreiras, pomares, jardins, etc.). São os principais micro-organismos que compõem a comunidade microbiana na superfície de frutos e folhas, sendo esta considerada uma vantagem no biocontrole de doenças de pós-colheita (WILSON; WISNIEWSKI, 1991). Segundo Kurtzman e Fell (1998), o filoplano é um nicho ecológico habitado por saprófitas e parasitas. Os nutrientes que estão disponíveis nesse substrato servem de base para o desenvolvimento das populações de leveduras que são depositadas através do vento ou carreamento por insetos e outros organismos (ANDREWS; HARRIS, 2000; HERZBERG, 2004).

A população de micro-organismos varia conforme condições físicas e nutricionais no filoplano, como: luz, temperatura, umidade e, principalmente, disponibilidade de água (RUINEN, 1963). Algumas leveduras produzem abundantemente pigmentos carotenóides, provavelmente, como fator de proteção à exposição de luz direta na folha (ATLAS; BARTHA, 1997). Outras apresentam características que contribuem para permanência na superfície externa de diversas plantas, como produção de balistosporos, que são os esporos que são lançados à distância e podem ser dispersos pelo vento (LINDOW; BRANDL, 2003). A disponibilidade de carbono como nutriente nas folhas é o principal determinante na colonização epifítica (LINDOW; BRANDL, 2003). Sabe-se que, frutas são importantes microhabitats para uma variedade de espécies de leveduras na natureza, devido à alta concentração de açúcares e baixo pH (LACHANCE; STARMER, 1998).

A utilização de leveduras no controle de doenças em pós-colheita tem sido estudada por vários pesquisadores (ALVES, 2007; BLUM et al., 2004; BENDO; VIECELLI, 2009; COELHO et al., 2011; FIALHO, 2004; GASPERINI, 2011; MCLAUGHLIN et al., 1992; MOURA, 2007; OLIVEIRA, 2011; SANHUEZA, 1998; TOFFANO, 2010). O potencial antagonico das leveduras foi verificado pela primeira vez nos anos 80, onde foi constatada a redução do crescimento e esporulação de alguns fitopatógenos (PUNJA; UTKHEDE, 2003). As primeiras espécies de leveduras citadas como eficientes agentes de controle de doenças foram *Candida guilliermondii* (Castell.) Langeron & Guerra, *C. albidus* Saito & Skinner var. *aerius*, *Debaryomyces hansenii* (Zopf) Lodder & Kreger-Van Rij, *Hanseniospora uvarum*

(Niehaus) Shehata e *Cryptococcus laurentii* Kufferath, as quais foram usadas em pós-colheita de fruta e hortaliças. Outros gêneros de leveduras também já foram relatados mostrando eficiência no biocontrole, como os gêneros *Debaryomyces*, *Kloeckera*, *Sporothrix*, *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Sporobolomyces*, *Metschnikowia*, *Tilletiopsis*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Aureobasidium*, *Pichia* e *Candida* (LIMA et al., 1998; CASTORIA et al., 2001; MASIH; SANTOS et al., 2004; EL-TARABILY; SIVASITHAMPARAM, 2006). Como já mencionado, um dos principais fatores que leva a utilização das leveduras como agentes de biocontrole é a baixa possibilidade toxigênica deste grupo, não tendo sido relatado casos de micotoxicose (COELHO et al., 2003).

Alguns estudos também verificaram a eficiência de espécies de leveduras no controle biológico de fungos do gênero *Colletotrichum*: *Pichia guilliermondii* (Wick.), *Candida musae* (Nakase) SA Mey & Yarrow), *Issatchenkia orientalis* (Kudryavtsev) e *Candida quercitrusa* (SA Mey & Phaff) contra *Colletotrichum capsici* ((Syd.) EJ Butler & Bisby) em pimentão (*Capsicum annum* L.), na Tailândia (CHANCHAICHAOVIVAT et al., 2008); *Torulaspota globosa* (Klocker) Van der Walt & Johannsen) para inibir a *Colletotrichum sublineolum* (Henn. ex Sacc. & Trotter) em sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) no Brasil; *Candida membranifaciens* (Lodder & Kreger) Wick. & Burton) usado contra *C. gloeosporioides* em manga (*Mangifera indica* L.) na Etiópia (KEFIALEW; AYALEW, 2008); *Meyerozyma caribbica* Kurtzman e Susuki contra *Colletotrichum gloeosporioides* ((Penz.) Penz. & Sacc.) em manga (BAUTISTA-ROSALES et al., 2013).

Controle alternativo através do uso de extratos vegetais

As plantas produzem diversos compostos orgânicos, muitos dos quais não participam diretamente de seu desenvolvimento. Estes compostos podem ser divididos em dois grupos: os metabólitos primários, tais como carboidratos, aminoácidos e lipídeos; e os secundários que são compostos elaborados a partir da síntese dos metabólitos primários, tais como compostos fenólicos, terpenóides, alcalóides entre outros (SIMÕES et al., 1999). Os compostos secundários são, em sua maioria, responsáveis pelos efeitos medicinais, ou tóxicos das plantas, além de apresentarem grande importância ecológica, pois atuam na atração de polinizadores e na ativação da defesa química da planta contra estresse ambiental (BALADRIN et al., 1985; DI STASI, 1996), além de desempenharem papel fundamental nas suas interações de defesa contra predadores e patógenos (CROTEAU et al., 2000).

Em decorrência do aumento desta resistência dos fitopatógenos, a busca por substâncias antimicrobianas derivadas de plantas vêm sendo uma alternativa em constante crescimento (COELHO et al., 2004).

As plantas tem acompanhado o ser humano por milhares de anos até os dias atuais (LEONTI, 2011; GURIB-FAKIM, 2006), sendo utilizadas na alimentação e para fins medicinais por vários povos. São constituídas de um rico arsenal de substâncias com potencial ação sobre sistemas biológicos (Horst, 2012). Desta forma, têm-se enfatizado a necessidade de se buscar estudos multidisciplinares (MACIEL et al., 2002), visando a descoberta de novos compostos biologicamente ativos, especialmente promissoras fontes de novos agentes antimicrobianos, oriundos de espécies vegetais (LEITÃO et al., 2006; SILVA et al., 2007; COUTINHO et al., 2008).

O interesse pela elucidação dos constituintes do metabolismo secundário das plantas tem aumentado a cada dia e estimulado a busca nos vegetais, de novos compostos com atividades biológicas. Neste sentido, a fitoquímica ganha espaço aliada a outros ramos da ciência.

A pesquisa fitoquímica tem por objetivo conhecer os constituintes químicos de espécies vegetais ou avaliar sua presença, seja através do isolamento, purificação e/ou caracterização destes. Quando não se dispõe de estudos químicos sobre as espécies de interesse, a análise fitoquímica preliminar pode indicar o grupo de metabólitos secundário relevante da mesma. Caso o interesse esteja restrito a uma classe específica de constituintes ou às substâncias responsáveis por uma determinada atividade biológica, a investigação deverá ser direcionada para o isolamento e a elucidação estrutural da mesma (SIMÕES ET al., 1999).

Dentro deste aspecto, cabe ressaltar a necessidade de uma atuação multidisciplinar que o estudo com as plantas exige, incluindo desde o ponto de vista fitoquímico, até estudos abordando os aspectos agrotecnológico, microbiológico, farmacológico e biotecnológico, de tal forma que esta integração possa propiciar uma ampliação nas possibilidades na busca de novas moléculas ativas. Do ponto de vista microbiológico têm-se a avaliação por meio de ensaios biológicos, visando a descoberta de inúmeros princípios ativos promissores.

Os produtos naturais, como extratos e óleos essenciais vem sendo cada vez mais utilizados como uma alternativa ao uso de produtos químicos (AMMAR; NENAAH; HAMED, 2013; ARAÚJO et al., 2012; BANDEIRA et al., 2013; BONETT et al., 2012; CARNEIRO et al., 2007; DINIZ et al., 2006; GARCIA et al., 2012; PERINI et al., 2013; SOUZA et al., 2007; ŠVECOVÁ et al., 2013; VELOZ-GARCÍA et al., 2010; VOGT et al.,

2013). Apesar destes produtos naturais originados de plantas serem conhecidos há séculos, as pesquisas nesta área só tomaram maiores proporções nos últimos trinta anos a partir do advento tecnológico especialmente na área de química analítica.

Devido a ampla diversidade de substâncias presentes nas plantas, existe uma grande possibilidade de serem encontrados metabólitos que apresentem potencial contra fitopatógenos e que no futuro possam servir de base para síntese de novos fungicidas. A exploração da atividade antimicrobiana de defesa utilizando compostos secundários presentes nos extratos vegetais constitui-se uma forma potencial para controle de doenças em plantas cultivadas (SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN, 2005).

A literatura tem registrado a eficiência de extratos obtidos de uma gama de espécies vegetais promovendo a inibição de vários fitopatógenos (AMMAR; NENAAH; HAMED, 2013; ARAÚJO et al., 2012; BANDEIRA et al., 2013; BONETT et al., 2012; CARNEIRO et al., 2007; DINIZ et al., 2006; GARCIA et al., 2012; İŞERI et al., 2012; KURITA et al., 1981; PERINI et al., 2013; SOUZA et al., 2007; ŠVECOVÁ et al., 2013; VELOZ-GARCÍA et al., 2010; VOGT et al., 2013; WILSON et al., 1997).

A diversidade de substâncias ativas em plantas tem motivado o desenvolvimento de pesquisas visando explorar suas propriedades fungitóxicas (FRANZENER et al., 2005), podendo verificar a eficiência de extratos vegetais sob diferentes fitopatógenos, especialmente de natureza fúngicas. Dentre as diversas plantas estudadas e comprovadamente antifúngicas, podem ser citadas: arruda, melão-de-são-caetano, eucalipto (CELOTO et al., 2008), cavalinha, hortelã (ROZWALKA et al., 2008), alho e canela (VIEGAS et al., 2005), cravo-da-índia (AMARAL; BARA, 2005), nim (CARNEIRO et al., 2008), pimenta (BASTOS, 1992; BARROS et al., 1995; BASTOS, 1997), uva (ARAÚJO et al., 2009), entre outras.

Azadirachta indica

A espécie *Azadirachta indica* A. Juss, pertencente a ordem Sapindales, família Meliaceae, gênero *Azadirachta*, conhecida popularmente como Nim, nim indiano, neem, nem, margosa, é uma árvore nativa da Índia, característica de clima tropical (SOARES et al., 2001), que vem sendo utilizada há séculos para os mais variados fins (MOSSINI, KEMMELMEIER, 2005). É uma planta mundialmente conhecida pelas suas características medicinais de importância tanto para os homens como para os animais (NEVES et al, 2005).

Todos os produtos do nim são completamente naturais, não são tóxicos para o homem e nem para os animais domésticos (MOSSINI, KEMMELMEIER, 2005). O nim tem

atividade inseticida e medicinal; ele e seus derivados chegam a afetar mais de 400 espécies de insetos pertencentes a diversas ordens (NEVES, 2005). O princípio ativo presente nos frutos, sementes, folhas, casca do caule e raízes do nim apresenta eficácia, por exemplo, contra alguns fungos (*Aspergillus* sp.; *Penicillium* sp.; *Cercospora kikuchii*; *Colletotrichum* sp.; *Fusarium solani*; *Phomopsis* sp.) e tem atividade anti-virótica.

Esta espécie vegetal possui um tronco de robusto a curto, podendo chegar de 12 – 15 m, raramente 25m, e cresce cerca de 80cm no primeiro ano (LORENZI, 2003). Apresentam folhas alternadas, imparipenada, sempre verdes, caindo somente em caso de seca extrema. As flores apresentam pétalas brancas, bissexuadas e liberam compostos voláteis agradáveis ao olfato humano; brotam em feixes axiais, em inflorescências de 25cm. Os frutos têm de 1,5 a 2,0cm de comprimento, tem a cor amarelada quando maduros, são lisos, glabros e elipsóides. A árvore normalmente começa a frutificar 3 - 5 anos após o plantio. Apresentam produção superior a 25kg após o quinto ano (MOSSINI, KEMMELMEIER, 2005) .

O nim é facilmente propagado, tanto sexualmente quanto vegetativamente, podendo ser plantado por meio de sementes, mudas, árvores novas, brotos de raiz ou tecido de cultura (SOARES et al., 2001). Por ser de clima tropical, desenvolve-se bem em temperaturas acima de 20° C, com precipitações de 400 a 800mm e em altitudes superiores a 700m. É uma espécie que resiste a longos períodos de estiagem, e floresce até mesmo em solos pobres em nutrientes, porém não suporta locais encharcados e salinos, tem pH ideal do solo 6,2 à 7,0. Seu florescimento se dá normalmente entre fevereiro e maio e seus frutos amadurecem entre junho e agosto (SCHUMUTTERER, 1990).

Nim é considerada uma espécie resistente, podendo, ser plantada em qualquer área do planeta. É uma planta nativa da Índia, Indonésia, Malásia, Mianmar, Paquistão, Senegal, Sri Lanka, Tailândia. Por apresentar característica de clima tropical, ocorre de forma exótica em toda América Central, Sul do Pacífico, parte da América do Sul (encontrada em todas as regiões do Brasil), Ásia e África (ORWA et al., 2009) .

De acordo com Martinez (2008) as primeiras mudas de nim chegaram ao Brasil na década de 80, através do Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR) em Londrina – PR. Ainda de acordo com esta autora, na década de 90, as propriedades da planta tornaram-se mais conhecidas no Brasil, dando-se início ao plantio de grandes áreas comerciais em São Paulo, Goiás, Mato Grosso, Pará, Tocantins e outros.

No Nordeste, mais especificamente no município de Timbaúba-PE, na Usina Cruangi, existe uma plantação de nim com mais de 500ha de área cultivada e uma área total de

expansão de 1500ha. Nesta está localizada a empresa Cruangi Nim do Brasil LTDA e esta plantação já produz frutos (HARAND, 2008).

Do ponto de vista químico, uma característica comum às espécies da família Meliaceae é a presença de uma classe de triterpenos, conhecidos como limonóides (NEVES et al., 2005). Estes são conhecidos por apresentar atividade contra insetos, interferindo no crescimento ou na alimentação (SENTHIL et al., 2006), nas plantas que normalmente não são atacadas por insetos e são, provavelmente, os maiores representantes da classe dos terpenos com atividade inseticida (VIEGAS-JÚNIOR, 2003).

O principal composto presente na *A. indica* é a azadiractina. Este encontra-se presente tanto nas folhas como nos frutos e sementes, sendo um modelo de referência para este grupo de compostos, que até hoje é estudado na busca pelo entendimento da atividade biológica, toxicidade, biodegradabilidade, impacto ambiental entre outros aspectos (VIEGAS-JÚNIOR, 2003). Além da azadiractina, um número considerável de outros componentes já foi isolado das diversas partes do nim (NEVES et al, 2005), a exemplo de: meliacin, gedunin, salanin, nimbin, valassin dentre outros.

Os principais constituintes químicos de nim são terpenos e limonóides. Os principais componentes ativos limonóides são azadiractina, 3-desacetil-3-cinnamoylazadirachtin, I-tigloyl-3-acetil-II-methoxyazadirachtin, 22, 23-di-hidro-23 β -methoxyazadirachtin, nimbanal, 3-tigloylazadirachtol, 3-acetil-salannoV nimbidioV margocin, margocinin, margocilin e outros (OGBUEWU, 2011). Os Terpenóides são isoazadirolide, 6 nimbocinolide, nimbonone, nibonolone, methylgrevillate e Margosinone.

A atividade biológica do nim é relatada pelo extrato da raiz, das folhas, da casca e sementes. No entanto o extrato bruto de diferentes partes do nim tem sido usado na medicina tradicional para o tratamento de diversas doenças (BISWAS et al., 2002). Relatos na literatura têm exibido grande diversidade de funções biológicas a partir de um grupo de compostos presentes na planta (BARAL; CHATTOPADHYAY, 2004).

Na literatura tem-se verificado o relato da eficiência do nim na promoção da inibição do desenvolvimento de diversos micro-organismos, dentre os quais bactérias e fungos fitopatogênicos (CARNEIRO, 2002).

Diferentes produtos do nim (torta, extrato de folhas, óleo) têm sido testados para o controle de doenças do sistema radicular, parte aérea e pós-colheita, com resultados positivos em vários casos (CARNEIRO, 2002). Abbasi et al. (2003) verificaram que o óleo de nim foi eficiente no controle de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye em tomate e pimentão em casa de vegetação.

Govindachari et al. (1998), estudando a atividade antifúngica de terpenóides constituintes do óleo de nim, observaram que a azadiractina não afetou o crescimento de *Drechslera oryzae* (Breda de Haan) Subram. & Jain, *Fusarium oxysporum* Schlechtendal e *Alternaria* sp., enquanto que a salanina, nimbina, epoxiazadiradiona, deacetilnimbina e azadiradiona, apresentaram diferentes níveis de controle. Foi verificado que entre estes terpenos estudados pelos autores apresentaram maior ação quando testados em conjunto do que testados isoladamente.

Carneiro (2003) observou que o óleo de nim a 0,25% ou 0,5% controlou o oídio do tomateiro em casa de vegetação. Srinivas et al. (2000) observaram que o óleo de nim a 0,5% e 1% controlou a cercosporiose do amendoim e aumentou a produção de maneira significativa em relação à testemunha. Bhutta et al. (2001) avaliaram o efeito do nim no controle de fungos em sementes de girassol. Os autores verificaram que uma solução a 1% obtida a partir de sementes de nim reduziu em quase 100% a porcentagem de incidência de *Alternaria alternata* (Fries) Keissler nas duas cultivares estudadas, além de controlar outros fungos como *Fusarium* spp. O extrato de sementes de nim a 0,5% e 1% *in vitro*, inibiu o crescimento de *A. alternata* e *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. (1947) (1999).

Carneiro et al. (2007) avaliando o efeito do óleo, do extrato de sementes e do extrato de folhas de nim no controle do oídio do feijoeiro, em casa de vegetação, verificaram que o óleo foi eficiente para o controle da doença quando aplicado antes ou depois do surgimento dos sintomas. O extrato de sementes controlou a doença nas três concentrações testadas (35; 25 e 15g/L). Entretanto, verificou-se que o extrato de folhas não foi eficiente no controle do oídio do feijoeiro.

Outros trabalhos foram realizados buscando verificar a eficácia desta espécie contra vários outros fungos fitopatogênicos, como é o caso de *Pyricularia oryzae* (Cooke) Sacc., (1880) (AMADIOHA, 2000), *Erysiphe pisi* DC. (PRITHIVIRAJ et al., 1998) e *Plasmopara viticola* (Berk. & M.A. Curtis) Berl. & De Toni 1888 (STEINHAEUER, 1999).

Piper marginatum

A família Piperaceae é constituída por cinco a oito gêneros (DYER; PALMER, 2004), com aproximadamente 4000 espécies. A distribuição dessas espécies ocorre em regiões tropicais e subtropicais, podendo ter diferentes hábitos de crescimento, desde arbustos ou trepadeiras (a grande maioria) até árvores (em raros casos) (DI STASI et al., 2002; KATO; FURLAN, 2007; QUIJANO-ABRIL et al., 2006).

Piper L. e *Peperomia* Ruiz & Pav. são os dois principais gêneros desta família, tendo aproximadamente 2000 (SILVA; BASTOS, 2007) e 1500 espécies (WANKE et al., 2006), respectivamente. A maioria das espécies de *Piper* habita lugares úmidos, quentes, várzeas de florestas tropicais. As plantas pertencentes a este gênero, apesar de estarem localizadas em todos os tipos de vegetação, fazem parte da vegetação conhecida como vegetação pioneira (KATO; FURLAN, 2007; PARMAR et al., 1997; SANTOS et al., 2001).

Algumas espécies de Piperaceae vêm sendo utilizadas há centenas de anos, seja na alimentação (*Piper nigrum* L.) ou na medicina tradicional (SINGH, 1992; PARMAR et al., 1997; SCOTT et al., 2008). Desta forma, sua importância nas farmacopeias de diversos países tropicais está bem estabelecida (PARMAR et al., 1997).

A espécie *P. nigrum*, cujas sementes são utilizadas popularmente como a “pimenta-do-reino”, é uma das mais conhecidas e estudadas quimicamente. Esta espécie possui alto valor comercial principalmente como condimento devido ao seu sabor picante, que é atribuído a amidas aromáticas, em especial a piperina (SEMLER; GROSS, 1988).

Outra espécie de *Piper* de interesse científico é *P. marginatum* L.. Esta é encontrada na América do Sul, América Central e Antilhas e no Brasil, onde ocorre nos estados de Pernambuco, Paraíba, Amazonas, Pará e Ceará (GUIMARÃES; GIORDANO, 2004).

Conhecida popularmente como capeba, malvavísco, pimenta-do-mato, capeba-cheirosa e nhandi, a espécie *P. marginatum* é utilizada na medicina popular como calmante, no tratamento de doenças do baço e fígado, como diurético, no tratamento de picadas de cobra e insetos, além de ação anti-espasmódica (CHAVES; OLIVEIRA; SANTOS, 2006). Na culinária pode ser utilizada substituindo a pimenta-do-reino (GUIMARÃES; GIORDANO, 2004).

Potencial antifúngico de espécies de Piperaceae

A família Piperaceae vêm sendo cada vez mais estudada, mostrando uma grande diversidade quanto a composição química de seus metabólitos secundários (ANDRADE et al. 2008; SANTOS et al., 1998; CHAVES; SANTOS, 2002; CHAVES et al., 2006). Inseridas neste contexto, as espécies de *Piper* vêm mostrando o potencial de metabólitos secundários com ação antifúngica (ALÉCIO et al., 1998; NAVICKENE et al., 2000; BALDOQUI et al., 1999; DANELUTTE et al., 2003; LAGO et al., 2004; SALAZAR et al., 2005). Dentre os metabólicos verificados com potencial antifúngico, podem ser mencionadas as lignanas, neolignanas, terpenos, propenilfenóis, chalconas, flavonas, benzopiranos e amidas. Essas

últimas constituem metabólitos característicos de Piperaceae e podem ser classificadas em isobutílicas, pirrolidínicas, piridônicas e piperidínicas (SENGUPTA; RAY, 1987).

O potencial antifúngico das espécies de Piperaceae foi investigado por alguns autores: sesquiterpenos presentes no óleo essencial das folhas de *P. diospyrifolium* Kunth como principais componentes com potencial antifúngico contra *Candida albicans* (Robin) Berkhout, *C. parapsilosis* (Ashford) Langeron & Talice e *C. tropicalis* (VIEIRA et al., 2011); extratos de folhas de *P. belte* L. eficazes na redução do crescimento micelial de vários patógenos que atacam o arroz (TEWARI; NAYAK, 1991); extratos de folhas e o óleo essencial de *P. aduncum* L. inibindo a germinação de esporos e crescimento micelial de *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer, (1943) (BASTOS, 1997); extrato bruto de *P. betle* com atividade antifúngica contra *Colletotrichum capsici* (Syd.) E.J. Butler & Bisby (1931) (JOHNNY et al., 2011).

Apesar de algumas espécies de *Piper* apresentarem estudos relacionados a atividade antimicrobiana, poucos são aqueles direcionados ao controle de fitopatógenos, especialmente quando se trata de estudos com *P. marginatum*. Esta espécie tem poucos relatos de estudos voltados ao controle de patógenos de plantas, como podemos observar na tabela 1.

Tabela 1- Estudos da atividade antimicrobiana de *Piper marginatum*.

Parte da Planta/Produto	Procedência	Atividade Biológica	Referência
Folha/óleo essencial	Medicilândia, PA/Brasil	<i>Crinipellis pernicioso</i> ; <i>Phytophthora palmivora</i> ; <i>P. capsici</i>	Silva e Bastos, 2007
Folha/extrato	Manaus, AM/ Brasil	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	Reigada et al., 2007
Folha/óleo essencial	Guantánamo/Cuba	<i>Xanthomonas albilineans</i> (Ashby) Dowson; <i>X. campestris</i> pv <i>campestris</i> (Pammel) Dowson; <i>Alternaria solani</i>	Sánchez et al., 2011
Folha/óleo essencial	Guantánamo/Cuba	<i>X. albilineans</i>	Sánchez et al., 2012

Apesar da gama de pesquisas realizadas visando o controle biológico em pós-colheita através da utilização de leveduras, bem como os diversos estudos realizados com *A. indica* e *P. marginatum* no controle alternativo de fitopatógenos, os estudos no controle de *Colletotrichum* sp. são escassos, especialmente relacionados à cultura do pimentão. Diante do exposto, a presente pesquisa objetivou avaliar a eficiência de leveduras no controle biológico da antracnose do pimentão em testes *in vivo* e *in vitro* e analisar a eficácia de extratos vegetais de *A. indica* e *P. marginatum* contra *Colletotrichum scovillei* Damm.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBASI, P. A.; CUPPELS, D. A.; LAZAROVITS, G. Effect of foliar applications of nim oil and fish emulsion on bacterial spot and yield of tomatoes and peppers. **Canadian Journal Plant Pathology**, Ottawa, v. 25, p. 41-48, 2003.

ABH. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE HORTICULTURA. Disponível em:<<http://www.abhorticultura.com.br/Dicas/Default.asp?id=1735>> Acesso em: 15 fev. 2013.

ALÉCIO, A. C.; BOLZANI, V. S.; YOUNG, M. C. M.; KATO, M. J.; FURLAN, M. Antifungal amide from leaves of *Piper hispidum*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 61, p. 637-639, 1998.

ALVES, M. L. N. **Avaliação do potencial de leveduras dos gêneros *Pseudozyma* e *Rhodosporidium* no controlo biológico pós-colheita de bolores**. 2007. 102 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Farmácia, Lisboa.

AMADIOHA, A. C. Controlling rice blast *in vitro* and *in vivo* with extracts of *Azadirachta indica*. **Crop Protection**, Guildford, v. 19, n. 5, p. 287-290, 2000.

AMARAL, M. F. Z. J.; BARA, M. T. F. Avaliação da atividade antifúngica de extratos de plantas sobre o crescimento de fitopatógenos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, Goiânia, v. 2, n. 2, p. 5-8, 2005.

AMMAR, M. I.; NENAAH, G. E.; HAMED, A. H. M. Antifungal activity of prenylated flavonoids isolated from *Tephrosia apollinea* L. against four phytopathogenic fungi. **Crop Protection**, Guildford, v. 49, p. 21–25, 2013,

ANDRADE, E. M. **Variabilidade morfocultural e patogênica de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causal da antracnose do mamoeiro (*Carica papaya* L.)**. 2003. 70 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Brasília, Brasília.

ANDRADE, E. H.; CARREIRA, L. M.; SILVA, M. H. L.; SILVA, J. D.; BASTOS, C. N.; SOUZA, P. J.; GUIMARÃES, E. F.; MAIA, J. G. S. Variability in essential oil composition of *Piper marginatum* sensu lato. **Chemistry & Biodiversity**, Zürich, v. 5, p. 197-208, 2008.

ANDREWS, J. H.; HARRIS R. F. The ecology and biogeography of microorganisms on planta surfaces. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 38, p. 145-180, 2000.

ARAÚJO, E. R.; ARAÚJO, E. R.; RÊGO, E. R.; NASCIMENTO, L. C. Efeito In Vitro de Extratos e Tinturas de Uva e Banana sobre o Crescimento Micelial de *Elsinöe ampelina*, agente Causal da Antracnose da Videira. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Porto Alegre, v. 4, p. 2808-2811, 2009.

ARAÚJO, E. R.; Costa e Carvalho, R. R.; FONTES, M. G.; LARANJEIRA, D. L.; BLANK, A.; ALVES, P. B. Antifungal activity of essential oils of *Lippia* species of *Colletotrichum* sp. *in vitro*. In: III INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON MEDICINAL AND NUTRACEUTICAL PLANTS AND III CONFERENCE OF NATIONAL INSTITUTE OF SCIENCE & TECHNOLOGY FOR TROPICAL FRUITS, 2012, Aracaju. **Resumos...** Campinas: sBCTA/SE, 2012.

ATLAS, R. M.; BARTHA, R. **Microbial ecology: fundamentals and applications**. 4^a. ed. California: Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., 1997. 694 p.

ANVISA. **Toxicologia. Relatório ano 2010 Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/para>>. Acesso em 17 jul. 2010.

AZEVEDO, L. A. S. **Fungicidas protetores: fundamentos para o uso racional**. Emopi: Editora e Gráfica. Campinas, 2003. 319 p.

AZEVEDO, C. P.; HENZ, G. P.; CAFÉ FILHO, A. C.; REIS, A. **Recomendações de manejo da antracnose do pimentão e das pimentas**. Brasília: EMBRAPA HORTALIÇAS, 2006 (EMBRAPA HORTALIÇAS. Comunicado Técnico).

BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. (Eds) *Colletotrichum: biology, pathology and control*. England, CAB Internacional Wallingford, 1992. 388 p.

BALADRIN, M. F. et al.. Natural plant chemicals. Source of industrial and medicinal materials. **Science**, Washington, v. 228, p. 1054-1060, 1985.

BALDOQUI, D. C.; KATO, M. J.; CAVALHEIRO, A. J. BOLZONI, V. S.; UOUNG, M. C. M.; FURLAN, M. New chromene and prenylated benzoic acid from *Piper aduncum*. **Phytochemistry**, New York, v. 51, p. 899-902, 1999.

BANDEIRA, R. A.; LIMA, R. A. efeito do extrato etanólico dos frutos de *Solanum grandiflorum* Ruiz sobre *Fusarium oxysporum* Kühn in vitro. **Saúde e Pesquisa**, Maringá, v. 6, n. 1, p. 69-73, 2013.

BARAL, R.; U. CHATTOPADHYAY. **International Immunopharmacolog**, Amsterdam, v. 4, p. 355-66, 2004.

BARROS, S. T.; OLIVEIRA, N. T.; MAIA, L. C. Efeito do extrato de alho (*Allium sativum*) sobre o crescimento micelial de *Curvularia* spp. e *Alternaria* spp. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v. 21, p. 168-170, 1995.

BASTOS, C. N. Efeito do óleo de *Piper aduncun* sobre *Crinipellis pernicioso* e outros fungos fitopatogênicos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, p. 441-443, 1997.

BASTOS, C. N. Inibição do crescimento micelial e germinação de esporos de *Crinipellis pernicioso* e *Phytophthora palmivora* por extrato de bulbo de alho. **Fitopatologia brasileira**, Brasília, v. 17, p. 454-457, 1992.

BAUTISTA-ROSALES, P. U.; CALDERON-SANTOYO, M.; SERVÍN-VILLEGAS, R.; OCHOA-ÁLVAREZ, N. A.; RAGAZZO-SÁNCHEZ, J. A. Action mechanisms of the yeast *Meyerozyma caribbica* for the control of the phytopathogen *Colletotrichum gloeosporioides* in mangoes. **Biological Control**, Orlando, v. 65, p. 293–301, 2013.

BENDO, M. I.; VIECELLI, C. A. Controle biológico de *Rhizopus nigricans* em pós-colheita de morango pela utilização da levedura *Saccharomyces cerevisiae* e leite in natura. **Cultivando o Saber**, Cascavel, v. 2, n. 3, p. 23-35, 2009.

BERNSTEIN, B.; ZEHR, E. I.; DEAN, R. A. Characteristics of *Colletotrichum* from peach, apple, pecan and other hosts. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 79, p. 478-482, 1995.

BHUTTA, A. R.; BHATTI, M. H. R.; IFTIKHAR, A. Effect of seed diffusates on fungal population and germination of sunflower seeds. **Hélia**, Novi Sad, v. 24 n. 34, p. 77-81, 2001.

BIANCHETTI, L. B. **Aspectos morfológicos, ecológicos e biogeográficos de dez táxons de *Capsicum (Solanaceae)* ocorrentes no Brasil**. 1996. 174 f. Dissertação (Mestrado). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília.

BLUM, L. E. B.; AMARANTE, C. V. T.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M.; GUIMARÃES, L.S.; DEZANET, A.; NETO, P. H. *Cryptococcus laurentii* aplicado em pós-colheita reduz podridões em maçãs. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 4, p. 433-436, 2004.

BONETT, L. P.; MÜLLER, G. M.; WESSLING, C. R.; GAMELLO, F. P. Extrato etanólico de representantes de cinco famílias de plantas e óleo essencial da família Asteraceae sobre o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* coletados de frutos de mamoeiro (*Carica papaya* L.). **Revista Brasileira de Agroecologia**, Porto Alegre, v. 7, n. 3, p. 116-125, 2012.

BUENO, C. R. N. C. Identificação e caracterização das espécies de *Colletotrichum* causadoras de antracnose em hortaliças solanáceas. 2005. 61 f. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

CARNEIRO, S. M. T. P. G. Ação do nim sobre fungos fitopatogênicos. In: Martinez, S.S. **O Nim – *Azadirachta indica*: natureza, usos múltiplos, produção**. Londrina: Instituto Agrônômico do Paraná, 2002. p. 59-64.

CARNEIRO, S. M. T. P. G. Efeito de extratos de folhas e do óleo de nim sobre o oídio o tomateiro. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 29, n. 3, p. 262-265, 2003.

CARNEIRO, S. M. T. P. G.; PIGNONI, E.; VASCONCELOS, M. E. C.; GOMES, J. C. Eficácia de extratos de nim para o controle do oídio do feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v. 33, n. 1, p. 34-39, 2007.

CARNEIRO, S. M. T. P. G.; PIGNONI, E.; GOMES, J. C. Efeito do nim (*Azadirachta indica* A. Juss.) no controle da mancha angular do feijoeiro. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 10, n. 3, p. 6-10, 2008.

CASALI, V. W. D.; COUTO F. A. A. Origem e botânica de *Capsicum*. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, 1984. v. 10. 113 p.

CASTORIA, R.; DE CURTIS, F.; LIMA, G.; CAPUTO, L.; PACIFICO, S.; DE CICCO, V. *Aureobasidium pullulans* (LS-30) an antagonist of postharvest pathogens of fruits: study on its modes of action. **Postharvest Biology and Technology**, Washington, v. 22, n. 1, p. 7-17, 2001.

CEASA PE - Centro de Abastecimento Alimentar de Pernambuco – CEASA/PE. Calendário de comercialização de hortigranjeiros 2011. Disponível em: <<http://www.ceasape.org.br/calendariopdf/calendariodecomercializacaodehortigranjeiros2011.pdf>> Acesso em: 04 de ago. 2013.

CEASA-PE. **Participação e procedência dos produtos comercializados na CEASA-PE**. Recife: Central de Abastecimento de Pernambuco, 2005.

CELOTO, M. I. B.; PAPA, M. F. S.; SACRAMENTO, L. V. S. do; CELOTO, F. J. Atividade antifúngica de extratos de plantas a *Colletotrichum gloeosporioides*. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 30, p. 1-5, 2008.

CERKAUSKAS, R. **Pepper diseases: anthracnose**. Shanhua; Asian Vegetable Research and Development Center, 2004. 2 p. (AVRDC. Fact Sheet, 574).

CHANCHACHAOVIVAT, A.; BHINYO, P.; RUENWONGSA, P. Putative modes of action of *Pichia guilliermondii* strain R13 in controlling chilli anthracnose after harvest. **Biological Control**, Orlando, v. 47, p. 207-215, 2008.

CHANG, S. H.; CHUNG, B. K. Studies on the varietal resistance and effect of nutrients for fungal growth of pepper anthracnose disease caused by *Colletotrichum dematium* f.sp. *capsicum*. **Korean Journal Mycological**, Seoul, v. 13, n. 2, p. 227-234, 1985.

CHAVES, M. C.O.; SANTOS, B. V. Constituents from *Piper marginatum* fruits. **Fitoterapia**, Milano, v. 73, p. 547-548, 2002.

CHAVES, M. C. O.; OLIVEIRA, A. H.; SANTOS, B. V. O. Aristolactams from *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxyford, v. 34, n. 1, p. 75-77, 2006.

COELHO, A. R.; HOFFMANN, F. L.; HIROOKA, E. Y. Biocontrole de doenças póscolheita de frutas por leveduras: perspectivas de aplicação e segurança alimentar. **Ciências Agrárias**, Teresina, v. 24, p. 337-358, 2003.

COELHO, G. S.; HAAS, A. P. S.; VON POSER, G. L.; SHAPOVAL, E. E. S., ELISABETSKY, E. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 90, p. 135-143. 2004.

COELHO, A.R.; NÓBREGA, G. M. A.; PAGNOCCA, F. C.; HOFFMANN, F. L.; HARADAS, K. I.; HIROOKA, E. Y. Avaliação do potencial antagônico de leveduras, visando biocontrole de deterioração por *Penicillium expansum*. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, n. 1, p. 1879-1892, 2011.

COOK, R. J.; BAKER, K. F. **The nature and practice of biological control of plant pathogens**. Saint Paul: American Phytopathological Society, 1983. 539 p.

COUTINHO, H. D. M.; COSTA, J. G. M.; LIMA, E. O; FALCÃO- SILVA, V. S.; SIQUEIRA-JÚNIO, J. P. O. Enhancement of the Antibiotic Activity against a Multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. Chlorpromazine. **Chemotherapy**, Switzerland, v. 54, n. 4, p. 328-330, 2008.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Natural products (secondary metabolites). In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. **Biochemistry & molecular biology of plants**. American Society of Plant Physiologists, Lancaster, 2000. p. 1250-1268.

DAMM, U.; CANNON P.F. ; WOUDEBERG J. H. C.; CROUS, P.W. The *Colletotrichum acutatum* species complex. **Studies in Mycology**, v.73, p.37-113, 2012.

DANELUTTE, A. P.; LAGO, J. H. G.; YOUNG, M. C. M.; KATO, M. J. Antifungal flavones and prenylated hidroquinones from *Piper crassinervium* Kunth. **Phytochemistry**, New York v. 64, p. 555-559, 2003.

DE WITT, D.; BOSLAND, P. W. A brief history of pepper growing. In: DE WITT, D.; BOSLAND, P. W. (eds). **The pepper garden**. Berkeley: Ten Speed, 1993. p. 5-21.

DINIZ, L. P.; MAFFIA, L. A.; DHINGRA, O. D.; CASALI, V. W. D.; SANTOS, R. H. S.; MIZUBUTI, E. Avaliação de produtos alternativos para controle da requeima do tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 2, 2006.

DI STASI, L.C. **Plantas Mediciniais**: arte e ciência. São Paulo, SP: Unesp, 1996.

DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A.; SOUZA-BRITO, A. R. M.; MARIOT, A.; SANTOS, C. M. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. São Paulo SP. Editora UNESP, 2002, 2^a. ed.

DYER, L. A.; PALMER, A. D. N. **Piper: A Model Genus for Studies of Pytochemistry, Ecology, and Evolution**. Kluwer Academic Publisher/New York, 2004.

EL-TARABILY, K. A.; SIVASITHAMPARAM, K. Potential of yeasts as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. **Mycoscience**, Tokyo, v. 47, n. 1, p. 25-35, 2006.

FERNANDES, M. C. A.; SANTOS, A. S.; RIBEIRO, R. L. D. Adaptação patogênica de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* obtidos de frutos de jiloeiro, pimentão e berinjela. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna v. 28, n. 4, p. 325-330, 2002.

FIALHO, M. B. **Efeito in vitro de *Saccharomyces cerevisiae* sobre *Guignardia citricarpa*, agente causal da pinta preta dos citros.** 2004. 70 f. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

FILGUEIRA, F. A. **Novo manual de olericultura: Agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças.** 2^a. ed. Viçosa, Editora: UFV, 2005. 412 p.

FRANZENER, G. **Proteção de tomateiro a *Meloidogyne incognita* pelo extrato aquoso de *Tagetes patula*.** 2005. 58 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal C. Rondon.

FREEMAN, S.; RODRIGUEZ, R. J. Differentiation of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose of strawberry by arbitrarily primed PCR. **Mycological Research**, Inglaterra, v. 99, n. 4, p. 501-504, 1995.

FREEMAN, S., KATAN, T.; SHABI, E. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 82, p. 596-605, 1998.

FREEMAN, S.; KATAN, T. Identification of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose and root necrosis of strawberry in Israel. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 87, n. 5, p. 516-521, 1997.

GARCIA, R. A.; JULIATTI, F. C.; BARBOSA, K. A. G.; CASSEMIRO, T. A. Atividade antifúngica de óleo e extratos vegetais sobre *Sclerotinia sclerotiorum*. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 28, n. 1, p. 48-57, 2012.

GASPERINI, A. M. **Biocontrole de *Fusarium verticillioides* em milho.** 2011. 53 f. Monografia (Tecnologia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

GHINI, R.; KIMATI, H. **Resistência de fungos a fungicidas.** 1^a. ed. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. 78 p.

GOVINDACHARI, T. R.; SURESH, G.; GOPALAKRISHNAN, G.; BANUMATHY, B.; MASILAMANI, S. Identification of antifungal compounds from the seed oil of *Azadirachta indica*. **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v. 26, n. 2, p. 109-116, 1998.

GUIMARÃES, E. F.; GIORDANO, L. C. S. Piperaceae do nordeste brasileiro I: estado do Ceará. *Rodriguésia*, Rio de Janeiro, v. 55, n. 84, p. 21-46, 2004.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, Elmsford, v. 27, n. 1, p. 1-93, 2006.

HORST, H. Investigação fitoquímica e biológica da espécie *Esenbeckia leiocarpa* engl. 2012. 250 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Santa.

HAMERSCHMIDT, I. Produção de hortaliças e assistência técnica no Brasil. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 11, n. 2, p. 156-158, 1993.

HARAND, W. **Bioinseticida e outras aplicações tecnológicas do nim**. HARAND, W. (Org.). In: 1º Workshop Bioinseticida e outras aplicações tecnológicas do nim, Recife, 2008.

HARRIS, D. C. **Análise química quantitativa**. 7ª. ed Rio de Janeiro: LTC, 2008. 868 p.

HAWKSWORTH, D. L.; KIRK, P. M., SUTTON, B. C.; PEGLER, D. N. **Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi**. 8ª. ed. London: CAB International, 1995. 616 p.

HERZBERG, M. B. Ecology of yeast in plant-bumblebee mutualism in Central Europe. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 50, p. 87-100, 2004.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Censo Agropecuário. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2006. Disponível em:

<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/brasil_2006/Brasil_censoagro2006.pdf> Acesso em: 08 jun. 2013.

JOHNNY, L.; YUSUF, U. K.; NULIT, R. Antifungal activity of selected plant leaves crude extracts against a pepper anthracnose fungus, *Colletotrichum capsici* (Sydow) butler and

bisby (Ascomycota: Phyllachorales). **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 10, n. 20, p. 4157-4165, 2011.

KATO, M. J.; FURLAN, M. Chemistry and evolution of Piperaceae. **Pure and Applied Chemistry**, Oxford, v. 79, p. 529-538, 2007.

KEFIALEW, Y.; AYALEW, A. Postharvest biological control of anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) on mango (*Mangifera indica*). **Postharvest biology and technology**, Amsterdam, v. 50, p. 8-11, 2008.

KOIKE, S. T.; GLADDERS, P.; PAULUS, A. O. **Vegetable diseases: a color handbook**. San Diego: Academic Press, 2006. 320 p.

KURITA, N.; MAKOTO, M.; KURANE, R.; TAKAHARA, Y. Antifungal activity of components of essential oils. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 45, p. 945-952, 1981.

KUROZAWA, C.; PAVAN, M. A.; KRAUSE-SAKATE, R. Doenças das solanáceas. In: KIMATI, H. *et al.* (Eds.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4^a.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005, p. 589-596.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. **The yeasts, a taxonomic study**. 4^a.ed. Amsterdam: Elsevier, 1998. 1055 p.

LACHANCE, M. A.; STARMER, W. T. Ecology and yeasts. In: Kurtzman, C. P., Fell, J. W. (ed). **The Yeasts – A Taxonomy Study**. 4^a.ed. Amsterdam: Elsevier Science, 1998. p. 21-30.

LAGO, J. G. L.; RAMOS, C. S.; CASANOVA, C. C. D.; MORANDIM, A. A.; BERGAMO, C. D.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M.; GUIMARÃES, E. F.; YOUNG, M. C. M.; KATO, M. J. Benzoic acid derivatives from Piper species and their fungitoxic activity against *Cladosporium cladosporioides* and *C. shaeospermum*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 67, p. 1783-1788, 2004.

LEITÃO, S. G.; CASTRO, O.; FONSECA, E. M.; JULIÃO, L. S.; TAVARES, E. S.; LEO, R. R. T.; VIEIRA, R. C.; OLIVEIRA, D. R.; LEITÃO, G. G.; MARTINO, V.; SULSEN, V.;

BARBOSA, Y. A. G.; PINHEIRO, D. P. G.; SILVA, P. E. A.; TEIXEIRA, D. F.; LOURENÇO, M. C. S. Screening of Central and South American plant extracts for antimycobacterial activity by the Alamar Blue test. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 16, p. 6-11, 2006.

LEONTI, M. The future is written: Impact of scripts on the cognition, selection, knowledge and transmission of medicinal plant use and its implications for ethnobotany and ethnopharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, n. 134, p. 542-555, 2011.

LIMA, G.; DE CURTIS, F.; CASTORIA, R.; DE CICCIO, V. Activity of the yeasts *Cryptococcus laurentii* and *Rhodotorula glutinis* against postharvest rots on different fruits. **Biocontrol Science and Technology**, Lethbridge, v. 8, n. 2, p. 257-267, 1998.

LINDOW, S. E.; BRANDL, M. T. Microbiology of the phyllosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 1875-1883, 2003.

LOPES, C. A.; ÁVILA, A. C. **Doenças do pimentão: diagnose e controle**. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 2003. 96 p.

LOPEZ, A. M. Q. Taxonomia, patogênese e controle de espécies do gênero *Colletotrichum*. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 9, p. 291-338, 2001.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M.; TORRES, V. A. M.; BACHER, L. B. **Árvores exóticas no Brasil: madeiras, ornamentais e aromáticas**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2003.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR, V. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MALDONADO, V. **O cultivo do pimentão**. Revista Cultivar Hortaliças e Frutas. n. 5, 2001. Disponível em: <<http://www.grupocultivar.com.br/site/content/artigos/artigos.php?id=100>> Acesso em: 05 mai. 2013.

MANANDHAR, J. B.; HARTMAN, G. L.; WANG, T. C. Anthracnose development on pepper fruits inoculated with *Colletotrichum gloeosporioides*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 79, n. 4, p. 380-383, 1995.

MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B.; GOME, A. M. A. Controle Biológico de Doenças Radiculares. In MICHEREFF, S. J.; MENEZES, M. (Eds.) **Ecologia de Patógenos Radiculares**. Recife: UFRPE, Imprensa Universitária, 2002. p. 3-7.

MARQUELLI, W. A.; SILVA, W. L. C. **Irrigação na cultura do pimentão**. Brasília: EMBRAPA HORTALIÇAS, 2012 (EMBRAPA HORTALIÇAS. Circular Técnica 101).

MARTINEZ, S. S. **O Nim - *Azadirachta indica* - um inseticida natural**. Londrina: IAPAR, 2008. p. 5.

MARVEL, J. K. **Biology and control of pepper anthracnose**. 2003. 84 f. Thesis (PhD). Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, USA.

MASIH, E. I.; PAUL, B. Secretion of β -1,3-Glucanases by the Yeast *Pichia membranifaciens* and Its Possible Role in the Biocontrol of *Botrytis cinerea* Causing Grey Mold Disease of the Grapevine. **Current Microbiology**, New York, v. 44, n. 4, p. 391-395, 2002.

McLAUGHLIN, R. J.; WILSON, C. L.; DROBY, S.; BEN-ARIE, R.; CHALUTZ, E. Biological control of postharvest diseases of grape, peach and apples with the yeasts *Kloeckera apiculata* and *Candida guilliermondii*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 76, n. 5, p. 470-473, 1992.

MELO, I. S. **Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos em controle Biológico**. eds. MELO, I. S. E AZEVEDO, J. L. Embrapa Meio Ambiente, v. 1, p. 17-67, 1998.

MENDES, M. A. S.; SILVA, V. L.; DIANESE, J. C.; FERREIRA, M. A. S. V.; SANTOS, C. E. N.; GOMES NETO, E.; URBEN, A. F.; CASTRO C. **Fungos em Plantas no Brasil**. Embrapa, SPI, 1998. 555 p.

MILLS, P. R.; SREENIVASAPRAAD, S. & BROWN, A. E. 1992. Detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* using PCR. **FEMS Microb. Lett.** v. 98, p. 137-144. In: LOPEZ, A. M. Q. Taxonomia, patogênese e controle de espécies do gênero *Colletotrichum*. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 9. p. 291-338, 2001.

MONTEIRO, A. J. A.; COSTA, H.; ZAMBOLIM, L. Doenças causadas por fungos e bactérias em pimentão e pimenta. In: ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R.; COSTA, H. (Eds.). **Controle de doenças de plantas: hortaliças**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2000. v. 2, p. 637-675.

MOSSINI, S. A. G.; KEMMELMEIER, C. A árvore Nim (*Azadirachta indica* A. Juss): Múltiplos Usos. **Acta Farm. Bonaerense**, Buenos Aires, v. 24, n. 1, p. 139-48, 2005.

MOURA, R. D. **Produtos biológicos e alternativos no controle de doenças pós-colheita em melão cantaloupe**. 2007. 66 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural do Semi-árido, Mossoró.

NEVES, B. P. das; OLIVEIRA, I. P. de; MACEDO, F. da R.; SANTOS, K. J. G. dos; RODRIGUES, C.; MOREIRA, F. P. Utilização medicinal de nim. **Revista Eletrônica Faculdade Montes Belos**, São Luís de Montes Belos, v. 1, n. 1, p. 107-118, 2005.

OGBUEWU, I. P.; ODOEMENAM, V. U.; OBIKAONU, H. O.; OPARA, M. N.; EMENALOM, O. O.; UCHEGBU, M. C.; OKOLI, I. C.; ESONU, B. O.; ILOEJE, M. U. The Growing Importance of Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) in Agriculture, Industry, Medicine and Environment: A Review. **Research Journal of Medicinal Plant**, v. 5, p. 230-245, 2011.

OLIVEIRA, A.V.; RABELO, P.R.; PORTES, C.S.; COELHO, A.R. Biocontrole in vitro de *Botrytis cinerea* por Leveduras killer Visando Aplicação em Morangos Pós-colheita. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, Guarapuava, v. 13, n. 3, p. 353-364, 2011.

ORWA, C.; MUTUA, A.; KINDT, R.; JAMNADASS, R.; ANTHONY, S. Agroforestry Database: a tree reference and selection guide version 4.0 (<http://www.worldagroforestry.org/sites/treedbs/treedatabases.asp>), 2009.

PAKDEEVARAPORN, P.; WASEE, S.; TAYLOR, P. W. J.; MONGKOLPORN, O. Inheritance of resistance to anthracnose caused by *Colletotrichum capsici* in *Capsicum*. **Plant Breeding**, Dordrecht, v. 124, n. 2, p. 206-208, 2005.

PARK, K. S.; KIM, C. H. Identification, distribution, and etiological characteristics of anthracnose fungi of red pepper in Korea. **Korean Journal of Plant Pathology**, Seoul, v. 8, n. 1, p. 61-69, 1992.

PARK, S. K. **Differential interaction between pepper genotypes and *Colletotrichum* isolates causing anthracnose**. 2005. 56 f. Dissertation (MSc) - Seoul National University, Seoul, 2005.

PARMAR, V. S.; JAIN, S. C.; BISHT, K. S.; JAIN, R.; TANEJA, P.; JHA, A.; TYAGI, O. D.; PRASSAD, A. K.; WENGEL, J.; OLSEN, C.; BOLL, P. M. Phytochemistry of the genus Piper. **Phytochemistry**, New York, v. 46, p. 597-673, 1997.

PERFECT, S. E.; HUGHES, H. B.; O'CONNELL, R. J. & GREEN, J. O. *Colletotrichum*: A model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 27, p. 186-98, 1999.

PERINI, V. B. M.; CASTRO, H. G.; SANTOS, G. R.; CHAGAS JÚNIOR, A. F.; CARDOSO, D. P.; AGUIAR, R. W. S.; SOARES, A. A. Effect of vegetal extract in the inhibition of mycelial growth of *Pyricularia grisea*. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, Gurupi, v. 4, n.1, p. 70-77, 2013.

PRITHIVIRAJ, B.; SINGH, U. P.; SINGH, K. P.; PLANK-SCHUMACHER, K. Field evaluation of ajoene, a constituent of garlic (*Allium sativum*) and nimazal, a product of nim (*Azadirachta indica*) for the control of powdery mildew (*Erysiphe pisi*) of pea (*Pisum sativum*). **Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz**, Stuttgart, v. 105, n. 3, p. 274-278, 1998.

PUNJA, Z. K.; UTKHEDE, R. S. Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 21, p. 400-407, 2003.

REIFSCHNEIDER, F. J. B.; RIBEIRO C. S. C. **Introdução e importância econômica**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2004. Disponível em: <<http://www.cnph.embrapa.br/sistprod/pimenta/index.htm>> Acesso em: 05 mai. 2013.

REIGADA, J. B.; TCACENCO, C. M.; ANDRADE, L. H.; KATO, M J.; PORTO, A. L. M.; LAGO, J. H. G. Chemical constituents from *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae) - antifungal activities and kinetic resolution of (RS)-marginatumol by *Candida antarctica* lipase (Novozym 435). **Tetrahedron: Asymmetry**, Oxford, v. 18, p. 1054–1058, 2007.

RUINEN, J. **The phyllosphere II: yeasts from the phyllosphere of tropical foliage**. Antonie van Leeuwenhoek, Amsterdam, 1963. p. 425-438.

ROZWALKA, L. C.; LIMA, M. L. R. Z. C.; MIO, L. L. M.; NAKASHIMA, T. Extratos, decoctos e óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas na inibição de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides* de frutos de goiaba. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 2, p. 301-307, 2008.

SALAZAR, K. J. M.; PAREDES, G. E. D.; LIUNCOR, L. R.; YOUNG, M. C. M.; KATO, M. J. Chromenes of polyketide origin in *Peperomia wilipetiola*. **Phytochemistry**, New York, v. 66, p. 573-579, 2005

SÁNCHEZ, Y.; CORREA, T. M.; ABREU, Y.; PINO, O. Efecto del aceite esencial de *Piper marginatum* jacq. Y sus componentes sobre *Xanthomonas albilineans* (Ashby) DAWSON. **Revista de Protección Vegetal**, La Habana, v. 27, n. 1, 2012.

SÁNCHEZ, Y.; CORREA, T. M.; ABREU, Y.; MARTÍNEZ, B.; DUARTE, Y.; PINO, O. Caracterización Química y Actividad Antimicrobiana del aceite esencial de *Piper marginatum* Jacq. **Revista de Protección Vegetal**, La Habana, v. 26, n. 3, p. 170-176, 2011.

SANHUEZA, R. M. V. Leveduras para o biocontrole de fitopatógenos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Eds.). **Controle biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, v. 3, p. 41-55, 2000.

SANHUEZA, R. M. V. Leveduras para o controle de fitopatógenos. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 6, 1998, Rio de Janeiro. *Anais...* Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1998. p. 340-343.

SANTOS, P. R. D.; MOREIRA, D. L.; GUIMARÃES, E. F.; KAPLAN, M. A. C. Essential oil analysis of 10 Piperaceae species from the Brazilian Atlantic Forest. **Phytochemistry**, New York, v. 58, p. 547-551, 2001.

SANTOS, A.; MARQUINA, D. Killer toxin of *Pichia membranifaciens* and its possible use as a biocontrol agent against grey mould disease of grapevine. **Microbiology**, Spencers Wood, v. 150, n. 8, p. 2527-2534, 2004.

SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; CRUZ, M.E.S.; STANGARLIN, J.R.; PASCHOLATI S.F. Efeito do extrato bruto de plantas medicinais na indução de fitoalexinas em soja e sorgo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, p. 346, 1997.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R. Extratos de óleos essenciais de plantas medicinais na indução de resistência. In: CAVALCANTI, L. S.; DI PIERO, R. M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S. F.; RESENDE, M. L. V.; ROMEIRO, R. S. (Ed.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005. p. 125-138.

SCOTT, I. M.; JENSEN, H. R.; PHILOGÈNE, B. J. R.; ARNASON, J. T. A review of Piper spp. (Piperaceae) phytochemistry, insecticidal activity and mode of action. **Phytochemical Review**, Leyden, v. 7, p. 65-75, 2008.

SCHUMUTTERER, H. Properties and potential of natural pesticides from the neem tree. **An. Revista de Entomologia**, Rio de Janeiro, v. 35, p. 271-297, 1990.

SENGUPTA, S.; RAY, A. B. The chemistry of Piper species, a review **Fitoterapia**, Milano, v. 58, n. 3, p. 147-166, 1987.

SENTHIL-NATHAN, S.; KALAIVANI, K.; SEHOON, K. Effects of *Dysoxylum malabaricum* Bedd. (Meliaceae) extract on the malarial vector *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae). **Bioresource Technology**, Essex, v. 97, p. 2077-83, 2006.

SHARMA, P. N.; KAUR, M.; SHAMA, O. P.; SHAMA, P.; PATHARIA, A. Morphological, pathological and molecular variability in *Colletotrichum capsici*, the cause of fruit rot of chillies in the Subtropical Region of North-western India. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 153, n. 2, p. 232-237, 2005.

SHIN, H. J.; CHEN, Z. J., HWANG, J. M.; LEE, S. G. Comparison of pepper anthracnose pathogens from Korea and China. **Plant Pathology Journal**, Seoul, v. 15, n. 3, p. 323-329, 1999.

SILVA, D. M. H.; BASTOS, C. N. Atividade antifúngica de óleos essenciais de espécies de Piper sobre *Crinipellis pernicioso*, *Phytophthora palmivora* e *Phytophthora capsici*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, p. 143-145, 2007.

SILVA, J. G.; SOUZA, I. A.; HIGINO, J. S.; SIQUEIRA JÚNIOR, J. P.; PEREIRA, J. V.; PEREIRA, M. S. V. Atividade antimicrobiana do extrato de *Anacardium occidentale* Linn em amostras multirresistentes de *Staphylococcus aureus*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, Curitiba, v. 17, n. 4, p. 572-577. 2007.

SIMÕES, O. M. C.; SCHENKEL, R. P.; GOSMANN, G.; MELLO, P. C. J.; MENTZ, A. L.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia da planta medicamento*. Porto Alegre: Florianópolis: Editora UFRGS/Editora UFSC, 1999.

SRINIVAS, T.; RAO, M. S.; REDDY, P. S.; REDDY, P. N. Comparative effects of plant extracts and chemicals of the management of leaf spot of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) **Tropical Agriculture**, London, v. 77, p. 58-60, 2000.

SOARES, F. P.; PAIVA, R.; NOGUEIRA, R. C.; OLIVEIRA, L. M.; PAIVA, P. D. O.; SILVA, D. R. G. Cultivo e usos do nim (*Azadirachta indica* A. Juss). *Boletim agropecuarário da UFLA*, n. 68, p. 1-14, 2001.

SOUZA, A. E. F.; ARAÚJO, E.; NASCIMENTO, L. C. Atividade antifúngica de extratos de alho e campim-santo sobre o desenvolvimento de *Fusarium proliferatum* isolado de grãos de milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 6, p. 465-471, 2007.

STANGARLIN, J. R.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; CRUZ, M. E. S.; NOZAKI, M. H. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 11, p. 16-21, 1999.

STEINHAEUER, B. Possible ways of using the nim tree to control phytopathogenic fungi. **Plant Research and Development**, Hamburg, v. 50, p. 83-92, 1999.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 67, n. 4, p. 491-502, 2003.

SUTTON, B. C. **The Coelomycetes**. Surrey: Commonwealth Mycological Institute, 1980. 696 p.

SUTTON, B. C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In J. A. Bailey and M. J. Jeger (ed.), *Colletotrichum: biology, pathology and control*. CAB International, Wallingford, United Kingdom, 1992. p. 1-26.

ŠVECOVÁ, E.; PROIETTI, S.; CARUSO, C.; COLLA, G.; CRINÒ, P. Antifungal activity of *Vitex agnus-castus* extract against *Pythium ultimum* in tomato. **Crop Protection**, Guildford, v. 43, 2013, p. 223–230.

TEWARI, S. N.; NAYAK, M. Activity of four-plant extracts against three pathogens of rice. **Tropical Agriculture**, West Indies, v. 68, p. 373-375, 1991.

TOFFANO, L. **Efeito dos extratos do albedo de *Citrus sinensis*, *Lentinula edodes*, *Agaricus blazei* e dos compostos orgânicos voláteis produzidos por *Saccharomyces cerevisiae* no controle da mancha preta dos citrus**. 2010. 79 f. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

TOZZE JÚNIOR, H. J.; BUENO, C. R. N. C.; MASSOLA-JÚNIOR Morphological and physiological characterization of *Colletotrichum* sp. isolates from solanaceous crops. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v. 32, n. 1, p. 71-79, 2004.

TOZZE JÚNIOR, H. J. Caracterização e identificação de espécies de *Colletotrichum* associadas a antracnose do pimentão (*Capsicum annuum*) no Brasil. 2007. 81 f. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

TOZZE JÚNIOR, H. J.; MELLO, B. A.; MASSOLA-JÚNIOR, N. S. Caracterização morfológica e fisiológica de isolados de *Colletotrichum* sp. causadores de antracnose em solanáceas. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, n. 1, p. 77-79, 2006.

VELOZ-GARCÍA, R.; MARÍN-MARTÍNEZ, R.; VELOZ-RODRÍGUEZ, R.; RODRÍGUEZ-GUERRA, R.; TORRES-PACHECO, I.; GONZÁLEZ-CHAVIRA, M. M.; ANAYA-LÓPEZ, J. L.; GUEVARA-OLVERA, L.; FERREGRINO-PÉREZ, A. A.; LOARCA-PIÑA, G.; GUEVARA-GONZÁLEZ, R. G. Antimicrobial activities of cascalote (*Caesalpinia cacalaco*) phenolics-containing extract against fungus *Colletotrichum lindemuthianum*. **Industrial Crops and Products**, v. 31, n. 1, 2010, p.134–138.

VIANA, F. M. P.; FREIRE, F. C. O.; Parente, G. B. **Controle das principais doenças do pimentão cultivado nas Regiões Serranas do Ceará**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2007 (EMPRAPA - Série Embrapa. Comunicado Técnico).

VIEGAS, E. C.; SOARES, A.; CARMO, M. G. F.; ROSSETTO, C. A. V. 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, S. C. H.; FERNANDO DE PAULO, L.; SVIDZINSKI, T. I. E.; DIAS FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V.; DE SOUZA, A.; YOUNG, M. C. M.; CORTEZ, D. A. G. Antifungal activity of *Piper diospyrifolium* Kunth (Piperaceae) essential oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 42, n. 3, 2011.

VOGT, V.; CIFUENTE, D.; TONN, C.; SABINI, L.; ROSAS, S. Antifungal activity *in vitro* and *in vivo* of extracts and lignans isolated from *Larrea divaricata* Cav. against phytopathogenic fungus. **Industrial Crops and Products**, v. 42, p.583–586, 2013.

VOORRIPS, R. E.; FINKERS, R.; SANJAYA, L., GROENWOLD, R. QTL mapping of anthracnose (*Colletotrichum* spp.) resistance in a cross between *Capsicum annuum* and *C. chinense*. **Theoretical and Applied Genetics**, Dordrecht, v. 109, n. 12, p. 1275-1282, 2004.

WALLER, J. M. *Colletotrichum* diseases of perennial and other cash crops. In: SUTTON, B. C. 1992. The genus *Glomerella* and its anamorph. In: Bailey, J.A. & JEGER, M. J. **Colletotrichum: biology, pathology and control**. England, CAB Internacional Wallingford, 1992. p. 1-26.

WANKE, S.; SAMAIN, M. S.; VANDERSCHAEVA, L.; MATHIEU, G.; GOETGHEBEUR, P.; NEINHUIS, C. Phylogeny of the genus *Peperomia* (Piperaceae) inferred from the trnk/matk region (cpDNA). **Plant Biology**, Stuttgart, v. 8, p. 93-102, 2006.

YOON, J. B.; PARK, H. G. Screening methods for resistance to pepper fruit anthracnose: pathogen sporulation, inoculation methods related to inoculum concentrations and post-inoculation environment. **Journal of the Korean Society for Horticultural Science**, Seoul, v. 42, n. 4, p. 389-393, 2001.

WAGNER, H.; WIESENAUER, M. **Fitoterapia: fitofármacos, farmacologia e aplicações clínicas**. 2ª. ed, São Paulo: Pharmabooks, 2006. v. 16, p. 1-4.

WILSON, C. L.; SOLAR, J. M.; EL GHAOUTH, A.; WISNIEWSKI, M. E. Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 81, n. 2, p. 204-210, 1997.

WILSON, C. L.; WISNIEWSKI, M. E.; BILES, C. L.; McLAUGHLIN, R.; CHALUTZ, E.; DROBY, E. Biological control of post-harvest diseases of fruits and vegetables: alternatives to synthetic fungicides. **Crop Protection**, Guildford, v. 10, p. 172-177, 1991.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
29
30
31

CAPÍTULO II

Biocontrol of bell peppers anthracnose using yeasts

Biocontrol

Dordrecht, Holanda

Qualis CAPES: A2

1 **Biocontrol of bell peppers anthracnose using yeasts**

2

3 Emmanuelle Rodrigues Araújo¹, Gisely Santana de França¹, Nelson Bernardi Lima¹, Sabrina
4 Stefanne Barboza², Rejane Pereira Neves², Rejane Rodrigues da Costa e Carvalho¹, Delson
5 Laranjeira¹

6

7 (1) Departamento de Agronomia, Área de Fitossanidade, Universidade Federal Rural de
8 Pernambuco, 52171-900, Recife, PE, Brasil;

9 (2) Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-420, Recife,
10 PE, Brasil.

11

12 **Emmanuelle Rodrigues Araújo**

13 **E-mail:** manucg@gmail.com

14

15 **ABSTRACT**

16 This work had as goal isolates and evaluate yeasts of bell peppers fruits as biocontrol agent, *in*
17 *vitro* and *in vivo* comparing with the utilization of the fungicide mancozeb; evaluate the
18 pathogenicity of *Colletotrichum* spp. and indicate the aggressive isolated. The aggressive
19 isolated was identified as *Colletotrichum scovillei*. The yeasts *Rhodotorula mucilaginosa* L6,
20 *Candida duobushaemulonii* sp. nov. L15 and *Candida natalensis* CG27 reduced the size of
21 the lesion caused by *C. scovillei* in postharvest in 81.44, 85.50 and 79.81 %, respectively. In
22 pre harvest *C. natalensis* was the most efficient specie in the periods evaluated (7, 14 e 21
23 days). The utilized yeasts were efficient in inhibit the mycelial growth of *C. scovillei in vitro*
24 through the production of volatile components. *R. mucilaginosa* produced toxin *Killer*. The
25 biocontrol of *C. scovillei* presented a promising alternative to the search of formulations from
26 yeasts to the use in camp and in postharvest.

27

28 **Keywords:** Antracnose, *Colletotrichum scovillei*, *Capisicum annum*, *Rhodotorula*
29 *mucilaginosa*, *Candida duobushaemulonii*, *Candida natalensis*.

30

31 **Introduction**

32 The utilization of synthetic fungicides in agriculture it's frequently used in disease
33 control in pre and postharvest (Obande et al. 2011; Zhu et al. 2010). However, the necessity
34 of using methods more secure, efficient, economic and not harmful to human health, animals

1 health and to environment has stimulated the research for alternatives methods of
2 phytopathogen control (Jamalizadeh et al. 2008).

3 In the last years, the use of biocontrol microorganisms has shown a great potential for
4 the management of postharvest disease (Jamalizadeh et al. 2011). Among these, the yeasts
5 have been applied with success in the biological control (Xu and Du 2012; Zhang et al. 2013).

6 One of the main advantages of use of yeasts is the fact that these can colonize the
7 surface of fruits and vegetables for long periods of time and produce extracellular
8 polysaccharides, that favor their survival, in the same time, that slows the growth of
9 pathogens, beyond the capacity of growth in low temperatures and colonize injuries
10 (Janisiewicz et al. 2010; Sharma et al. 2009). Furthermore, use different mechanism of action:
11 competition of nutrients and space, induction of resistance in the host tissue, production of
12 volatile metabolites, and production of the toxin *Killer* (Nantawanit et al 2010; Li et al. 2012;
13 Boukaew; Plubrukam and Prasertsan 2013; Portes et al. 2013).

14 The infections occasioned for species of *Colletotrichum* generate a series of problems,
15 which rots in pre and postharvest are the major, because they affect the production,
16 commercialization and exportation of fruits and vegetables (Sreenivasaprasad and Talhinhos
17 2005). This fungus causes anthracnose, one of the most limiting disease of the production
18 system of bell peppers in a global level. This is describe as deep necrotic lesions and
19 delimited in the tissues (Bailey and Jeger 1992), occasioned by *C. gloeosporioides* (Penz.)
20 Penz. and Sacc, *C. capsici* (Syd.) E.J. Butler & Bisby (1931), *C. acutatum* J.H. Simmonds
21 (1968), *C. dematium* (Persoon) Grove, *C. coccodes* (Wallroth) Hughes) and *C. scovillei*
22 Damm (Azevedo et al. 2006; Damm et al. 2012; Koike et al. 2006).

23 The objective of the work was isolate yeast of bell pepper fruits; evaluate the
24 pathogenicity of isolated of *Colletotrichum* spp. from bell pepper and indicate the most
25 aggressive; evaluate the factor *Killer* of yeasts *in vivo* and *in vitro* and the use of those in the
26 biocontrol of *Colletotrichum* spp. comparing the effects with the utilization of the fungicide
27 mancozeb in the control of bell pepper anthracnose.

28

29 **Materials and methods**

30 **Obtainment of isolates of *Colletotrichum* spp.**

31 Were obtained 30 isolates of *Colletotrichum* spp., eight belonging to the Collection of
32 Culture of phytopathogenic fungus “Prof. Maria Menezes” (CMM), three assigned by
33 Embrapa Vegetables and the others from isolated organic bell peppers fruits, from the county
34 of Chã Grande –PE. The samples were processed in the Laboratory of soil fungus, from the

1 area of Fitossanitary from Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE). The procedure of
2 disinfections and fungal isolation were realized in accord to Menezes and Assis (2004).

3 4 **Pathogenicity of isolates of *Colletotrichum* spp. In bell pepper fruits**

5 The bell pepper fruits after disinfected were used in the test of pathogenicity through
6 the Postulates of Koch. For the production of innocuous, the isolates were peaked in Potato
7 Dextrose Agar (PDA) and incubated In 28 ± 2 °C and photoperiod of 12h for 12 days. Were
8 realized injuries in the fruits and after inserted 100 µl of suspension of conidia from the
9 isolates of *Colletotrichum* in a concentration of 1×10^6 conidia/ml. The fruits were packed in
10 plastic trays and packed in a moist camera, for a period of 24 h. With seven days of
11 inoculation, with aid of the caliper rule, were realized the evaluation of the two orthogonal
12 diameters from the injured area.

13 14 **Identification of the pathogen**

15 The most aggressive isolates as for your pathogenicity was identified through the
16 molecular technique, being utilized for this identification only one gene (GAPDH). The
17 region (GAPDH) was sequenced in both directions, utilizing one ABI PRISM® 3100-Avant
18 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) in the platform of sequencing LABCEN/CCB in the
19 Federal University of Pernambuco (Recife, Brazil). The sequence obtained in this study was
20 stored in the GenBank and the isolates was stored in the Collection of Culture of
21 phytopathogenic fungus “Prof. Maria Menezes” (CMM) of UFRPE (Recife, Brasil).

22 23 **Isolation and identification of the yeasts**

24 Were obtained 60 isolates of yeasts from organic bell peppers fruits without the
25 symptoms anthracnose, from the counties of Chã-Grande-PE, Lagoa de Itaenga-PE, São
26 Lourenço da Mata-PE and Campina Grande-PB. The methodology of isolation and
27 preparation of yeasts suspension followed the methodology of França et al. (2013).

28 The yeast were identified observing taxonomic phenotypic characteristics following
29 Barnett et al. (2000) and molecular analysis using specific primers to the region D1/D2 of the
30 region 26S rDNA and the primers ITS1 and ITS4 of the region ITS, in the Platform of
31 Sequencing LABCEN/CCB from UFPE (Recife, Brazil). The isolates were stored in the
32 Micoteca URM from UFPE.

33

1 **Postharvest control of bell pepper anthracnose through use of yeasts**

2 The 69 isolates of yeast were tested relative the reduction of severity of anthracnose in
3 fruits, using the adapted methodology of França et al. (2013). The witness consisted of bell
4 pepper fruits with injuries, inoculated with the pathogen and treated with sterile distilled water
5 (ADE). The isolates that reduce the disease severity in at least 70% were selected for the
6 experiment *in vitro* and in greenhouse.

8 **Use of yeasts in the biocontrol of bell pepper anthracnose in greenhouse**

9 The experiment was realized in greenhouse with average temperature 30 °C and 67 %
10 of relative humidity. The pulverization treatment were realized in bell pepper fruits to the
11 point of runoff, once a week, during five weeks, being the first inoculation realized one week
12 before the inoculation of *Colletotrichum* sp. The suspension concentration of yeasts utilized
13 was 1×10^7 cell/ml⁻¹. The inoculated plants were packed in plastic bags by 24h, to packed them
14 in a humid camera condition.

15 Were realized injuries in the fruits and added in the local 100µl of suspension from the
16 phytopatogen in concentration of 1×10^6 conidia/ml. The fungicide mancozeb (Dithane) was
17 utilized in concentration of 2.5 g of active ingredient/L (positive control) and the witnesses
18 were pulverized with ADE and include with the pathogen. The resistance inductor
19 Acibenzolar-S-metil (ASM) was dissolved 0.1 gL⁻¹ of ADE. The chemic surfactant Tween 80
20 was added to the treatments with 0.03 % (v/v). The evaluation was realized measuring the
21 necrotic area in the fruit (multiplication of two measures diametrically opposed from the
22 lesion) the 7, 14 and 21 days after the inoculation (DAI).

24 **Effect of yeasts in the growth off bell pepper plants**

25 The roots and the aerial part of bell pepper plants, with approximately 110 days were
26 weighed in analytic balance to obtain the fresh biomass of the aerial part (BFPA) and the
27 fresh biomass of the root (BFR). Posteriorly, the material was packed in paper bags and
28 conducted to the warm house for dry 60 °C for five days. Posteriorly the samples were
29 weighed to obtain the fresh biomass of the aerial part (BSPA) and from the root (BSR).

31 **Sensibility *in vitro* of *Colletotrichum* spp. to yeasts**

32 The selected yeasts in the experiment of postharvest were evaluated due your
33 antagonism *in vitro* though the inhibition of mycelial growth of *Colletotrichum* sp. Two disks
34 of 0.5 cm of culture media containing structures from the pathogen were positioned at 0.5 cm

1 from the edges of the Petri dish containing the BDA culture media. The yeasts were sown in
2 stria in the center of the dish with aid of “Swabs”, previously immersed in suspension of
3 yeasts cells (1×10^7 cells mL^{-1}). The control consisted of the same procedure, although the stria
4 was realized with ADE. The dishes were kept at 28 ± 2 °C for 12 days. The evaluation was
5 realized measuring the halo of growth between yeasts and the pathogen.

6 The production of volatile compounds by the yeasts was evaluate utilizing the adapted
7 methodology by Macagnan (2005). The percentage of suspension in the mycelia growth of the
8 fungus (SCM) was expressed by the formula (SCM) % = $[(\text{DCC} - \text{DCT})/\text{DCC}] \times 100$ were
9 DCC = diameter of the fungus colony in the control portion and DCT = diameter of the
10 fungus colony in the treatment portion (Macagnan 2001).

11

12 **Evaluation of the production of toxin *Killer* by yeasts with biocontrol potential**

13 The activity *Killer* in the isolates of yeasts was investigated according to Kapsopoulou
14 et al. (2008).

15

16 **Statistical analysis**

17 In the experiment of postharvest control of anthracnose was utilized the completely
18 randomized design with 71 treatments (Witness + 69 yeasts isolates + mancozeb fungicide).
19 The comparison of the averages was through the Scott-Knott test at 5% of probability.

20 The use of yeasts in the biocontrol of anthracnose in bell pepper at the greenhouse and
21 the effect of yeasts in bell pepper plants growth were evaluated through the completely
22 randomized design, with six treatments (Witness; yeast L6; yeast L15; yeast CG27; ASM and
23 mancozeb) and ten repetitions (fruits). The averages were compared by the Tukey test at 5%
24 of probability.

25 For the evaluation of sensibility *in vitro* of *Colletotrichum* spp. to yeasts was adopted
26 the completely randomized design with four treatments (Witness; yeast L6; yeast L15 and
27 yeast CG27), with four repetitions (Petri dish). The comparison of the averages was through
28 the Tukey test at 5% of probability.

29 All the experiments were realized in duplicate and the statistical analysis were realized
30 utilizing the computational program ASSISTAT Version 7.6 beta (Silva and Azevedo 2009).

31

1 **Results**

2 **Pathogenicity of isolates of *Colletotrichum* spp. in bell pepper fruits and Identification of** 3 **the phytopathogen**

4 The isolated of COLL 100 identified as *C. scovillei* Damm caused more injuries in the
5 fruits of bell pepper (Table 1), being selected for the biocontrol test and stored in CMM with
6 register CMM-0092 and in the GenBank with the code KF137639.

8 **Identification of the promising yeasts in biocontrol**

9 The yeast were identified as *Rhodotorula mucilaginosa* (A. Jörg) F.C.
10 Harrison (*Rhodotorula rubra*) (L6), *Candida duobushaemulonii* sp. nov. E. Cendejas-Bueno
11 et al. (2012) (L15) and *Candida natalensis* van der Walt & Tscheuschner (1957) (CG27). The
12 yeasts were stored in the Collection of Cultures URM with registration URM-7040, URM-
13 7042 e URM-(in process of incorporating to collection), to *R. mucilaginosa* (L6), *C.*
14 *duobushaemulonii* (L15) and *C. natalensis* (CG27), respectively.

16 **Postharvest control of bell pepper anthracnose through the use of yeasts**

17 From the yeasts evaluated the isolates *R. mucilaginosa* L6, *C. duobushaemulonii* L15
18 and *C. natalensis* CG27 reduced the size of the injury occasioned by *C. scovillei* in more than
19 70% inhibiting the fungus mycelial growth in 81.44, 85.50 and 79.81 % (Table 2).

21 **Use of yeasts in biocontrol of anthracnose and the effect in growth promotion of bell** 22 **pepper plants**

23 The yeast *C. natalensis* CG27 reduced the injury caused by *C. scovillei* in the three
24 periods evaluated (7, 14 and 21 days) (Table 3), being more effective than the mancozeb
25 (fungicide) and statistically equivalent to acibenzolar-S-metil (ASM). The yeast *C.*
26 *duobushaemulonii* L15 at 14 and 21 does not differed statistically from the fungicide, as well
27 as did not occur difference of yeast *R. mucilaginosa* L6 at 14 days in relation to mancozeb.

28 In the experiment I (Table 4) the yeasts *R. mucilaginosa* L6 and *C. natalensis* CG27,
29 and the fungicide differed statistically from the others treatments and promoted the growth of
30 bell pepper plants through the variable BFPA, and obtaining a more satisfactory result,
31 including that the growth promoter ASM. Repeating the experiment, was verified that only *R.*
32 *mucilaginosa* L6 promoted the growth of this variable. To the variable BSPA, *R.*
33 *mucilaginosa* L6 and *C. duobushaemulonii* L15 were better than the others treatments,
34 although did not differed statistically from the witness, in both experiments (I and II).

1 Analyzing the BFR, in the experiment I, the yeast *C. duobushaemulonii* L15 was more
2 efficiently in the increment of this variable, differing statistically from the others treatments,
3 although the data not remained in experiment II, where the witness presented highest values
4 of BFR. To the variable BSR in experiment I, the yeast *C. duobushaemulonii* L15 increased
5 the biomass, although, the data were not confirmed in experiment II. The ASM was effective
6 only in the first evaluation, at seven days after the inoculation of the phytopathogen. The
7 fungicide was not efficient as the yeast *C. natalensis* CG27, and did not differed statistically
8 from *R. mucilaginosa* L6 and *C. duobushaemulonii* L15.

10 **Sensibility *in vitro* of *Colletotrichum scovillei* and production of Toxines *Killer* by yeasts**

11 The yeast *R. mucilaginosa* L6, *C. duobushaemulonii* L15 and *C. natalensis* CG27 did
12 not inhibit the mycelial growth of *C. scovillei in vitro*, not occurring the formation of inhibition
13 halo. The phytopathogen growth occurred beneath the yeast growth.

14 As for the growth inhibition of *C. scovillei* by volatile components (Table 5), the three
15 yeasts differed statistically from the witness, inhibiting the growth of the phytopathogen,
16 although *C. natalensis* CG27 differed statistically from the others (experiments I and II),
17 promoting a minor mycelial growth of the phytopathogen.

18 In relation the evaluation of the *Killer* activity, was verified that only the yeast *R.*
19 *mucilaginosa* L6, was able to produce the toxin *Killer*.

21 **Discussion**

22 Was obtained in this work the first account of *C. scovillei* in Brazil, after being
23 renamed by Damm et al. (2012). This fungus was part of the Complex of *C. acutatum*, due the
24 morphological characteristics that grouped them with this specie. Although analyzing
25 molecular parameters was verified that it was a distinct specie, being renamed as *C. scovillei*
26 (Damm 2012).

27 The yeasts, *R. mucilaginosa* L6, *C. duobushaemulonii* L15 and *C. natalensis* CG27
28 were efficient against *C. scovillei*, being considered promising as biocontrolers of this
29 pythophatogen in postharvest.

30 Searching an alternative to chemical control in postharvest, others species of yeasts
31 has been utilized: *R. glutinis* (H. Kufferath) C.E. Skinner against *Botrytis cinerea* and
32 *Penicillium expansum* in apple (Zhang et al. 2009); *R. glutinis* against *B. cinerea* *P.*
33 *expansum*, *Rhizopus stolonifer* and *Aspergillus niger* Van Tieghem in apple, peach,
34 strawberry, kiwi and grape (Lima et al. 1998); *C. guilliermondii*, *R. minuta* and *R. glutinis*

1 inhibiting the mycelial growth *in vitro* of *Ceratocystis paradoxa* (Dade) C. Moreau (Reyes et
2 al. 2004); *C. guilliermondii* reducing the postharvest rot in tomatoes fruits, occasioned by *R.*
3 *nigricans* Demelius (Zhao et al. 2008); *C. guilliermondii* in the control of *C. capsici* L. in chili
4 (Nantawanit et al. 2010). Although there are works realized with *R. mucilaginosa* controlling
5 phytopathogens *in postharvest*: *P. expansum* Link and *R. stolonifer* (Ehrenb.: Fr) Vuill. In
6 peach (Karabulut; Baykal, 2004); *P. expansum* and *B. cinerea* Pers. in apple (Li et al. 2011);
7 *P. expansum* in peach (Robiglio et al. 2011). There are no reports of this yeast in the
8 biocontrol in postharvest of vegetables, as in the present work. Therefore, this is the first
9 report of the use of *R. mucilaginosa* in the biocontrol of *C. scovillei* in bell pepper.

10 The present work recounts the first isolation of the yeast *C. duobushaemulonii* from
11 the bell pepper fruit, and your efficiency in the biocontrol of *C. scovillei*, not existing reports
12 of this specie in the bicontrol of phytopathogenic fungus.

13 Also few are the works realized utilizing *C. natalensis* in biocontrol of plant disease.
14 One of the reports observed the efficiency of this yeast reducing the incidence of *P. expansum*
15 in peaches and the severity and the incidence of this same pathogen in apples (Usall et al.
16 2001; Nunes et al. 2001; Torres et al. 2006).

17 The efficacy of the yeasts in the inhibition of *C. scovillei* in pre harvest was also
18 observed. Satisfactory results and that confirm the obtained in laboratory *C. natalensis* CG27
19 reducing the anthracnose and revealing as a potential biocontrol agent. This is a important
20 account, since few are the works with yeasts in camp and/or greenhouse that is obtained
21 promising results as this study.

22 Was observed that the tested yeasts, increased some variables, not to the point of use
23 them only as growth promoters, although came to be more efficient as the same ASM
24 commercially utilized to this goal.

25 In relation to the population of antagonist Lucon et al. (2010) emphasize that, to the
26 efficiency of the biological control, it's important that beyond of colonize the fruit superficies,
27 the antagonist must persist on it. About the yeasts, this survival may be directly related with
28 the population of extracellular polysaccharides in the fruits, in this case of bell pepper. The
29 yeasts, due a number of factors, among them your fast multiplication and competition for
30 nutrients, tends to slow the growth of pathogens (Sharma et al. 2009).

31 Despite de competition for space and specially for nutrients be a important action
32 mechanism of the yeasts (Spadaro et al. 2010), the tests realized related to sensibility *in vitro*
33 of *C. scovillei* to yeasts, demonstrated that probably the tested yeasts do not use antibioses

1 and/or competition against the phytopathogen what they do is release a volatile components,
2 since these were not in direct contact with *C. scovillei*.

3 Tests realized *in vitro* evaluating the effect of yeasts in the control of pathogen
4 associated to postharvest disease in orange and peach showed that *Aureobasidium pullulans*
5 (de Bary) G. Arnaud controlled *P. digitatum* (Sperandio 2012).

6 The factor *Killer* it's a differential that determined isolates of yeasts presents of inhibit
7 the growth of other microorganism. It is a toxic peptide released in the culture medium.
8 Although some species of yeasts presents the activity *Killer* (Kazantseva and Zimina 1989),
9 in the present work *R. mucilaginoso* L6 was the only capable to present this phenotype.

10 The success of the yeasts in the control of postharvest disease, probably occurs to the
11 sum of properties with absence of allergens spores, mycotoxins, metabolic antibiotics; simple
12 nutritional requirement allowing to colonize dry superficies for long periods; use available
13 nutrients, allowing to grow in a variety font of carbon; not utilize action mechanism that are
14 harmful to the consumer; possess cells containing vitamins; minerals and amino acids that
15 allows being inserted in the food (Druvefors 2004).

16 Despite of many studies, few are the biocontrollers that reaches the market as a
17 alternative to chemical control (Spadaro and Gullino 2004). Some yeasts commercialized as
18 biofungicides are: *C. oleophila* Montrocher and *Pseudozyma flocculosa*, available
19 commercially as AspireTM and Sporodex LTM, respectively (El-Ghaouth 1997; Sporodex
20 2002), being AspireTM utilized in postharvest control of *P. digitatum* (Pers.) Sacc. (1993) and
21 *P. italicum* Wehmer in citrus and Sporodex LTM against *pannosa* Wallr. Ex. Fries Lév. and *S.*
22 *fuliginea* (Schltdl.) Pollacci (1905) in roses and cucumbers.

23 The biocontrol is increasingly utilized to disease postharvest of fruits, although, few
24 are the works focused to biological control of disease postharvest of vegetables, as is the case
25 at the present work.

26 The bell pepper (*Capsicum annuum* L.) to be one of the most important vegetable
27 cultivated in Brazil, whose productive area has shown a expressive growth, losing only for
28 tomatoes (*Solanum lycopersicon* L.) and potato (*Solanum tuberosum* L.) with relation to the
29 cultivated area and quantity produced (IBGE 2006), deserves a special attention as to control
30 phytopathogens. Thus, the control of *C. scovillei* through yeasts as was observed in this study,
31 shown a promising alternative to the search of formulations from these yeasts to the use in the
32 camp and postharvest.

1 **Acknowledgments**

2 To National Council of Scientific and Technological Development (CNPq) by the
3 concession of the scholarship. To the Support Foundation to Science and Technology from
4 Pernambuco state (Facepe), by the financial support for the developed research. To Marília
5 Wortmann Marques by the aid in the identification of the isolates of *Colletotrichum scovillei*.

7 **Referências**

- 8
- 9 Azevedo CP (2006) Epidemiologia e controle da antracnose do pimentão e identificação de
10 *Colletotrichum* spp. associados à solanáceas cultivadas. Available via DIALOG
11 http://repositorio.unb.br/bitstream/10482/1860/1/2006_Caroline%20Pedroso%20de%20Azevedo.pdf. Cited 01 out 2012
- 12
- 13
- 14 Bailey JA, Jeger MJ (Eds) (1992) *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. CAB
15 Internacional Wallingford, England
- 16
- 17 Barnett JA, Paine RW, Yarrow D (2000) *Yeasts: characteristics and Identification*. Cambridge
18 University Press, Cambridge
- 19
- 20 Boukaew S, Plubrukam A, Prasertsan P (2013) Effect of volatile substances from
21 *Streptomyces philanthi* RM-1-138 on growth of *Rhizoctonia solani* on rice leaf. *BioControl*
22 58:471-482
- 23
- 24 Damm U, Cannon PF, Woudenberg JHC, Crous PW (2012) The *Colletotrichum acutatum*
25 species complex. *Studies in Mycology* 73:37-113
- 26
- 27 Druvefors UA (2004) Yeast biocontrol of grain spoilage moulds. Mode of Action of *Pichia*
28 *anomala*. 122 f. Tese (Doutorado) - Swedish University of Agricultural Sciences
- 29
- 30 El-Ghaouth A (1997) Biologically-based alternatives to synthetic fungicides for the control of
31 postharvest diseases. *J Ind Microbiol Biotechnol* 19:3:160-162
- 32
- 33 Franca GS, Carvalho RRC, Neves RP, Araújo ER, Laranjeira D (2013) Controle pós-colheita
34 da antracnose do pimentão pela levedura *Rhodotorula glutinis*. *Bioscience Journal*

- 1 IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Censo
2 Agropecuário. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2006. 777p
3
- 4 Jamalizadeh M, Etebarian HR, Alizadeh A, Aminian H (2008) Biological control of gray
5 mold on apple fruits by *Bacillus licheniformis* (EN74-1). *Phytoparasitica* 36:1:23-29
6
- 7 Jamalizadeh M, Etebarian HR, Aminian H, Alizadeh A (2011) A review of mechanisms of
8 action of biological control organisms against post-harvest fruit spoilage. *EPPO Bull* 41:65-71
9
- 10 Janisiewicz WJ, Kurtzman CP, Buyer JS (2010) Yeasts associated with nectarines and their
11 potential for biological control of brown rot. *Yeast* 27:389-398
12
- 13 Kapsopoulou K, Barouti E, Makrioniti A, Kostaki K (2008) Occurrence of *Saccharomyces*
14 *cerevisiae* killer yeasts in wine-producing areas of Greece. *World Journal of Microbiology*
15 *and Biotechnology* 24:9:1967-1971
16
- 17 Karabulut OA, Baykal N (2004) Integrated control of postharvest diseases of peaches with a
18 yeast antagonist, hot water and modified atmosphere packaging. *Crop Prot* 23:431-435
19
- 20 Kazantseva DI, Zimina MS (1989) Yeast killer strains with a broad spectrum of action: a
21 search among collection strains and preliminary classification. *Mikrobiologija* 58:2:291-297
22
- 23 Koike ST, Gladders P, Paulus AO (2006) *Vegetable diseases: a color handbook*. Academic
24 Press, San Diego
25
- 26 Li Q, Ning P, Zheng L, Huang J, Li G, Hsiang T (2012) Effects of volatile substances of
27 *Streptomyces globisporus* JK-1 on control of *Botrytis cinerea* on tomato fruit. *Biol Control*
28 61:113-120
29
- 30 Li RP, Zhang HY, Liu WM (2011) Zheng, X.D. Biocontrol of postharvest gray and blue
31 mold decay of apples with *Rhodotorula mucilaginosa* and possible mechanisms of action. *Int*
32 *J Food Microbiol* 146:151-156

- 1 Lima G, De-Curtis F, Castoria R, De-Cicco V (1998) Activity of the yeasts *Cryptococcus*
2 *laurentii* and *Rhodotorula glutinis* against postharvest rots on different fruits. *Postharvest Biol*
3 *Technol* 8:257-267
4
- 5 Lucon CMM, Guzzo SD, De Jesus CO, Pascholati SF, Goes A (2010) Postharvest harpin or
6 *Bacillus thuringiensis* treatments suppress citrus black spot in 'Valencia' oranges. *Crop*
7 *Protection* 29:7:766-772
8
- 9 Macagnan D. Seleção de procariotas residentes de filoplano visando o biocontrole da
10 vassoura-de-bruxa do cacauero (*Theobroma cacao* L.) incitada por *Crinipellis pernicioso*
11 (STAHÉL) SINGER. 57 f, 2001. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade
12 Federal de Viçosa, 2001
13
- 14 Macagnan D. Isolamento e Seleção de bactérias endosporogênicas e do tipo actinomicetos
15 visando biocontrole da vassoura-de-bruxa (*Crinipellis pernicioso*) e da podridão parda
16 (*Phytophthora* spp.) do Cacauero (*Theobroma cacao* L.) e estudos dos mecanismos de
17 antagonismo ao fungo *Crinipellis pernicioso*. 113 f, 2005. Tese (Doutorado em Fitopatologia)
18 – Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2005
19
- 20 Menezes M, Assis SMP (2004) Guia prático para fungos fitopatogênicos. Recife PE.
21 Imprensa Universitária, UFRPE.
22
- 23 Nantawanit N, Chanchaichaovivat A, Panijpan B, Ruenwongsa P (2010) Induction of defense
24 response against *Colletotrichum capsici* in chili fruit by the yeast *Pichia guilliermondii* strain
25 R13. *Biological Control* 52:145-152.
26
- 27 Nunes C, Usall J, Teixido N, Miro M, Vinas I (2001) Nutritional enhancement of biocontrol
28 activity of *Candida sake* (CPA-1) against *Penicillium expansum* on apples and pears. *Eur J*
29 *Plant Pathol* 107:543-551
30
- 31 Obande MA, Tucker GA, Shama G (2011) Effect of preharvest UV-C treatment of tomatoes
32 (*Solanum lycopersicon* Mill) on ripening and pathogen resistance. *Postharvest Biol Technol*
33 62:188-192

- 1 Portes CS, Oliveira AV, Simer P, Lunkes AM, Coelho AR (2013) Role of Killer Factors in
2 the Inhibitory Activity of Bio-control Yeasts against *Penicillium expansum* and *Aspergillus*
3 *ochraceus*. Braz Arch Biol Technol 56:4:619-627
4
- 5 Reyes MEQ, Rohrbach KG, Paull RE (2004) Microbial antagonists control postharvest black
6 rot of pineapple fruit. Postharvest Biol Technol 33:193-203
7
- 8 Robiglio A, Sosa MC, Lutz MC, Lopes CA, Sangorrín MP (2011) Yeast biocontrol of fungal
9 spoilage of pears stored at low temperature. Int J Food Microbiol 147:3:211-216
10
- 11 Sharma RR, Dinesh S, Rajbir S (2009) Biological control of postharvest diseases of fruits and
12 vegetables by microbial antagonists: A review. Biological Control 50:205-221
13
- 14 Silva FAZ, Azevedo CAV (2009) Principal Components Analysis in the Software Assistat-
15 Statistical Attendance. In: World Congress on Computers in Agriculture, 7, Reno-NV-
16 USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers
17
- 18 Spadaro D, Gullino ML (2004) State of the art and future prospects of the biological control
19 of postharvest fruit diseases. Int J Food Microbiol 91:2:185-194
20
- 21 Spadaro D, Ciavorella A, Dianpeng Z, Garibaldi AML (2010) Effect of culture media and pH
22 on the biomass production and biocontrol efficacy of a *Metschnikowia pulcherrima* strain to
23 be used as a biofungicide for postharvest disease control. Can J Microbiol 56:128-137
24
- 25 Sperandio EM (2009) Ocorrência, diversidade e potencial biotecnológico de leveduras
26 associadas a plantas do cerrado. Available via DIALOG
27 http://repositorio.unb.br/bitstream/10482/10783/1/2012_EugenioMirandaSperandio.pdf. Cited
28 03 jun 2013
29
- 30 Sporodex L (2002) End-use Product and *Pseudozyma flocculosa* strain PF-A22 UL Technical
31 Grade Active Ingredient. REG2002-02
32

- 1 Sreenivasaprasad S, Talhinas P (2005) Genotypic and phenotypic diversity in
2 *Colletotrichum acutatum*, a cosmopolitan pathogen causing anthracnose on a wide range of
3 hosts. Mol Plant Pathol 6:1:361-378
4
- 5 Torres R, Teixido N, Vinas I, Mari M, Casalini L, Giraud M, Usall J (2006) Efficacy of
6 *Candida sake* CPA-1 formulation for controlling *Penicillium expansum* decay on pome fruit
7 from different Mediterranean regions. J Food Protect 69:11:2703-2711
8
- 9 Usall J, Teixido N, Torres R, De Eribe XO, Vinas I (2001) Pilot tests of *Candida sake* (CPA-
10 1) applications to control post-harvest blue mold on apple fruit. Post-harvest Biology and
11 Technology 21:2:147-156
12
- 13 Xu L, Du Y (2012) Effects of yeast antagonist in combination with UV-C treatment on
14 postharvest diseases of pear fruit. BioControl, 57:3:451-461.
15
- 16 Zhao Y, Tu K, Shao X, Jing W, Su Z (2008) Effects of the yeast *Pichia guilliermondii* against
17 *Rhizopus nigricans* on tomato fruit. Postharvest Biol Technol 49:1:113-120
18
- 19 Zhang H, Wang L, Ma L, Dong Y, Jiang S, Xu B, Zheng X (2009) Biocontrol of major
20 postharvest on apple using *Rhodotorula glutinis* and its effects on postharvest quality
21 parameters. Int J Food Microbiol 126:167-171
22
- 23 Zhang C, Chen K, Wang G (2013) Combination of the biocontrol yeast *Cryptococcus*
24 *laurentii* with UV-C treatment for control of postharvest diseases of tomato fruit. BioControl
25 58:269-281
26
- 27 Zhu Z, Zhang Z, Qin G, Tian S (2010) Effects of brassinosteroids on postharvest disease and
28 senescence of jujube fruit in storage. Postharvest Biology and Technology 56:50–55
29

1 **Table 1 Pathogenicity of *Colletotrichum* spp. in bell pepper fruits after seven days of**
 2 **inoculation and storage at room temperature (25 ± 2 ° C)**

Code isolated <i>Colletotrichum</i> spp.	Diameter lesion (cm)		Code isolated <i>Colletotrichum</i> spp.	Diameter lesion (cm)	
	I*	II**		I*	II**
Control	0.00 e	0.00 d	COLL 5	1.74 c	2.12 c
COLL 100	2.48 a	3.32 a	CHÃ 107	1.76 c	2.07 c
COLL 4	2.03 b	2.45 b	CMM 0266	1.60 c	2.10 c
COLL 672-2	1.84 b	2.65 b	CHÃ 15	1.65 c	2.00 c
CMM 672	1.66 c	2.60 b	CHÃ 101	1.65 c	1.97 c
CHÃ 39	1.98 b	2.50 b	COLL 1	1.60 c	1.97 c
COLL 2	1.75 c	2.37 b	CHÃ 14	1.56 c	1.95 c
CHÃ 21	1.90 b	2.25 c	CMM 24	1.84 b	1.52 c
CHÃ 105	1.74 c	2.47 b	CHÃ 10	1.06 c	1.45 c
CMM 0221	1.68 c	2.40 b	COLL 673	0.63 d	1.37 c
CHÃ 17	1.74 b	1.85 c	CMM 0114	0.00 e	1.87 c
CHÃ 108	1.59 c	2.2 c	CMM 0217	0.00 e	0.50 d
CHÃ 103	1.64 c	2.17 c	CMM 525	0.00 e	0.50 d
CHÃ 37	1.59 c	2.17 c	CMM 0881	0.00 e	0.50 d
CHÃ 102	1.56 c	2.07 c	COLL 665	0.00 e	0.50 d
CHÃ 109	1.45 c	2.00 c	CV (%)	20.66	23.64

3 *Experiment I; ** Experiment II. Means followed by the same letter do not differ statistically
 4 from each other by the Scott-Knott test at 5% probability.

1 **Table 2 Reduction of anthracnose on bell pepper fruits in postharvest and mycelial growth of *Colletotrichum scovillei* by yeast, respectively**
 2 **assessed by lesion diameter (cm) and percentage inhibition of lesion size (PILS) (%).**

Yeast code	Lesion Diameter (cm)		PILS (%)		Yeast code	Lesion Diameter (cm)		PILS (%)	
	I*	II*	I*	II*		I*	II*	I*	II*
L15	0.49 f	0.45 f	82.36 b	85.50 b	CG26	1.36 d	1.38 c	51.34 d	55.25 e
L6	0.63 f	0.57 f	77.45 b	81.44 b	09C	1.38 c	1.41 c	50.67 e	54.24 e
CG27	0.63 f	0.62 f	77.45 b	79.81 b	L70	1.39 c	1.46 c	50.45 e	52.62 e
CG42.1	0.84 e	0.90 e	70.09 c	70.77 c	CG23.1	1.39 c	1.43 c	50.22 e	53.64 e
03RLI	0.84 e	0.86 e	69.87 c	72.17 c	CG30	1.44 c	1.48 c	48.43 e	52.00 e
SLM30	0.91 e	0.91 e	67.41 c	70.59 c	01LI	1.49 c	1.49 c	46.65 e	51.81 e
CG5	0.95 e	1.10 e	66.07 c	64.51 c	L4	1.50 c	1.47 c	46.43 e	52.41 e
CG35	0.95 e	1.01 e	66.07 c	67.15 c	L61	1.52 c	1.59 c	45.76 e	49.40 e
SLM28.1	1.00 e	1.06 e	64.28 c	65.54 c	CG66	1.53 c	1.51 c	45.31 e	51.20 e
CG45.2	0.98 e	1.24 d	64.95 c	64.54 c	31R	1.53 c	1.59 c	45.31 e	48.59 e
SLM14	1.00 e	1.00 e	64.06 c	67.75 c	L64	1.53 c	1.55 c	45.31 e	49.98 e
03BLI	1.06 e	1.04 e	62.28 c	66.31 c	07LI	1.54 c	1.56 c	45.09 e	49.41 e
SLM5	1.06 e	1.08 e	62.05 c	64.92 c	CG39	1.54 c	1.53 c	44.86 e	50.62 e
L2	1.04 e	1.11 e	62.72 c	63.92 c	L42	1.57 c	1.57 c	43.75 e	46.75 e
03B	1.05 e	1.11 e	62.50 c	63.91 c	L72	1.59 c	1.59 c	43.08 e	48.81 e
SLM15.2	1.09 e	1.10 e	61.83 c	64.52 c	SLM11	1.62 c	1.59 c	41.96 e	48.60 e

1

Table 2 Continuation

CG29.2	1.07 e	1.06 e	61.83 c	65.52 c	L62	1.63 c	1.61 c	41.74 e	47.97 e
CG9.2	1.14 d	1.13 e	59.37 d	63.312 c	L14	1.63 c	1.60 c	41.74 e	38.48 f
SLM2	1.14 d	1.13 e	59.37 d	63.32 c	14LI	1.69 b	1.74 b	39.73 f	43.75 f
CG8.1	1.14 d	1.22 d	59.37 d	60.51 d	L43	1.69 b	1.69 b	39.73 f	45.59 f
11C	1.16 d	1.24 d	58.70 d	59.89 d	L63	1.69 b	1.68 b	39.51 f	45.56 f
CG54	1.19 d	1.27 d	57.59 d	58.87 d	L68	1.72 b	1.71 b	38.39 f	44.77 f
CG47	1.19 d	1.10 e	57.36 d	64.31 c	L8	1.74 b	1.72 b	37.95 f	44.34 f
L71	1.20 d	1.17 d	57.14 d	62.10 d	L41	1.74 b	1.74 b	37.72 f	43.75 f
CG49	1.22 d	1.24 d	56.25 d	59.86 d	L13	1.76 b	1.75 b	37.05 f	43.55 f
07C	1.23 d	1.33 d	56.03 d	57.07 d	L46	1.78 b	1.78 b	36.38 f	42.55 f
04ALI	1.24 d	1.27 d	55.58 d	59.06 d	10RLI	1.79 b	1.79 b	36.16 f	42.34 f
10ALI	1.25 d	1.24 d	55.36 d	59.89 d	L48	1.8 2 b	1.78 b	35.04 f	42.56 f
22LI	1.26 d	1.25 d	55.13 d	59.50 d	L49	1.82 b	1.82 b	35.04 f	41.31 f
CG59	1.25d	1.27 d	55.13 d	58.87 d	23C	1.85 b	1.84 b	33.92 f	40.74 f
CG7	1.26 d	1.30 d	55.13 d	58.07 d	L44	1.87 b	1.95 b	33.03 f	37.07 f
CG42.2	1.27 d	1.33 d	54.46 d	57.06 d	L14	1.92 b	1.90 b	31.25 f	48.40 e
013BLI	1.31 d	1.30 d	53.35 d	58.07 d	L60	1.96 b	1.95 b	29.91 f	37.09 f
L69	1.31 d	1.31 d	53.12 d	57.88 d	Control	2.67 a	2.78 a	4.37 g	10.27 g
06CB	1.33 d	1.40 c	52.45 d	54.84 e	Mancozeb	1.05 e	1.05 e	62.50 b	62.50 c
CG11	1.35 d	1.35 d	51.78 d	56.45 d	CV%	17.18	16.74	16.31	13.57

2

*Experimento I, **Experimento II. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

1 **Table 3 Reduction of anthracnose on bell pepper fruits in preharvest yeast treated with**
 2 **fungicide (mancozeb) and resistance inducer (ASM), assessed by lesion diameter (cm).**

Treatments	Days after inoculation of <i>Colletotrichum scovillei</i>					
	7		14		21	
	I*	II**	I*	II**	I*	II**
Control	1.02 a	1.03 a	3.67 a	3.72 a	4.62 a	4.61 a
L6	0.93 ab	0.92 ab	2.47 c	2.40 c	3.10 b	3.11 b
L15	0.74 bc	0.76 bc	2.28 c	2.23 c	2.73 c	2.75 c
CG27	0.61 c	0.59 c	0.94 d	0.96 d	1.31 d	1.33 d
ASM	0.60 c	0.65 c	2.98 b	2.96 b	3.37 b	3.35 b
Mancozeb	0.78 bc	0.82 b	2.34 c	2.28 c	2.58 c	2.71 c
CV (%)	17.55	16.51	9.29	10.52	8.05	7.30

3 *Experiment I, **Experiment II. Means followed by the same lowercase letter in uppercase in
 4 the column and row do not differ among themselves by Tukey test at 5% probability.

5

1 **Table 4 Fresh biomass of shoots (FBS), shoot dry biomass (SDB), root fresh weight**
 2 **(RFW) and root dry biomass (RDB) of pepper plants with 110 days of planting, after**
 3 **treatment with yeast, aiming assessment promotion of plant growth.**

Treatments	FBS (g)		SDB (g)		RFW (g)		RDB (g)	
	I*	II**	I*	II**	I*	II**	I*	II**
Control	13.33 ab	13.75 ab	7.37 a	7.63 a	5.19 b	7.50 a	5.25 a	5.91 a
L6 ^a	16.24 a	15.08 a	7.53 a	8.19 a	5.54 ab	6.04 ab	2.88 b	2.94 c
L15 ^b	13.39 ab	13.76 ab	7.85 a	7.77 a	7.13 a	5.40 b	5.61 a	4.24 b
CG27 ^c	14.91 a	10.41 b	6.09 b	4.94 b	5.52 ab	5.82 ab	3.62 b	3.91 bc
ASM ^d	8.39 b	12.97 ab	5.33 bc	5.34 b	2.82 c	5.47 b	1.64 c	4.60 b
Mancozeb ^e	14.41 a	13.75 ab	4.99 c	4.99 b	4.57 bc	6.41 ab	3.14 b	3.89 bc
CV (%)	30.93	25.92	12.63	8.09	28.54	23.65	23.53	21.93

4 *Experiment I, **Experiment II, Means followed by the same lowercase and uppercase in the
 5 column on the line do not differ statistically among themselves by Tukey test at 5%
 6 probability.

7 ^aL6 = *Rhodothorula mucilaginosa*; ^bL15 = *Candida duobushaemulonii*; ^cCG27 = *Candida*
 8 *natalensis*; ^dASM = acibenzolar-S-metil ;^eMancozebe = Dithane NT.

9

1 **Table 5 Inhibition growth of *Colletotrichum scovillei* by volatile compounds produced by**
 2 **yeast.**

Treatments	Diameter of colony (cm)	
	I*	II**
Control	8.50 a	8.50 a
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> L6	3.44 b	3.37 b
<i>Candida duobushaemulonii</i> L15	3.51 b	3.50 b
<i>Candida natalensis</i>	1.11 c	1.13 c
CV (%)	4.41	5.42

3 * Experiment I, **Experiment II, Means followed by the same lowercase letter in uppercase
 4 in the column and row do not differ among themselves by Tukey test at 5% probability.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34

CAPÍTULO III

Extratos vegetais de capeba e nim no controle de *Colletotrichum scovillei* em pimentão

Pesquisa Agropecuária Brasileira

Brasília, Brasil

Qualis CAPES: A2

35 **Extratos vegetais de capeba e nim no controle de *Colletotrichum scovillei* em pimentão**

36

37 Emmanuelle Rodrigues Araújo⁽¹⁾, Wolfgang Harand⁽²⁾, Iwanne Coelho Lima⁽¹⁾, Fernanda
38 Carolina Ribeiro Dias⁽³⁾, Adelmo Adriane Duarte de Santana⁽¹⁾, Rejane Rodrigues da Costa e
39 Carvalho⁽¹⁾ e Delson Laranjeira⁽¹⁾

40

41 (1) Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Departamento de Agronomia, Área de Fitossanidade,
42 Laboratório de Fungos de Solos, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos - CEP: 52171-900 Recife, PE.

43 E-mail: manucg@gmail.com, coelho.iwanne@yahoo.com.br, adelmoadriane@ig.com.br,
44 rejanecosta@yahoo.com.br, delson@depa.ufrpe.br

45 (2) Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), Coordenador Central Analítica, Av. Prof. Luiz
46 Freire, 1, Cidade Universitária, CEP: 50740-540 Recife, PE. E-mail: wolfgang.harand@cetene.gov.br

47 (3) Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Departamento de Ciências Biológicas, CEP: 50670-420
48 Recife, PE E-mail: fernandaribeiro.dias@hotmail.com

49

50 **Resumo** – Objetivou-se avaliar extratos vegetais brutos de *Piper marginatum* Jacq. e
51 *Azadirachta indica* A JUSS e frações e compostos puros de *P. marginatum* comparando o
52 efeito com a utilização do fungicida mancozeb no controle da antracnose *in vitro* e em pós-
53 colheita de pimentão (*Capsicum annuum* L.), ocasionada por *Colletotrichum scovillei*.
54 Diferentes concentrações de extratos metanólicos e hexânicos de folhas de *P. marginatum* e
55 folhas e sementes de *A. indica* (125, 250, 500, 1000 e 2000 ppm) foram avaliadas sob o
56 crescimento micelial e porcentagem de inibição do crescimento micelial de *C. scovillei*.
57 Selecionou-se o extrato e a concentração mais eficiente para etapas posteriores de
58 fracionamento e purificação, utilizando-se técnicas cromatográficas. Após seleção da fração
59 bioativa contra *C. scovillei*, foram purificados 10 compostos em cromatografia preparativa por
60 HPLC que foram utilizados em novos bioensaios. O extrato de *P. marginatum* mostrou-se
61 promissor no controle deste fitopatógeno a partir de 1000 ppm. As frações de acetato de etila
62 e metanol desse extrato apresentaram uma eficácia muito maior que o extrato bruto, e o
63 composto 12 inibiu o crescimento micelial a partir de 1,5 ppm, sendo mais eficiente que o
64 fungicida mancozeb.

65

66 **Termos para indexação:** *Capsicum annuum*, antracnose, controle alternativo, *Piper*
67 *marginatum*, *Azadirachta indica*.

68

69 **Abstract** – Plant extracts of capeba and neem in controlling *Colletotrichum scovillei* in
70 bell pepper - This work aimed to evaluate crude plant extract *Piper marginatum* Jacq. and

71 *Azadirachta indica* A JUSS; fractions and pure compounds from *P. marginatum* comparing
72 the effect with the use of the mancozeb fungicide in controlling anthracnose *in vivo* and in
73 bell pepper (*Capsicum annuum* L.) post-harvest, caused by *Colletotrichum scovillei*. Different
74 concentrations of methanolic and hexanic extracts of *P. marginatum* leaves; leaves and seeds
75 of *A. indica* (125, 250, 500, 1000 e 2000 ppm) were evaluated under mycelial growth and
76 percentage inhibition of mycelial growth of *C. scovillei*. This selected extract and
77 concentration more efficient for subsequent steps of fractionation and purification, using
78 chromatograph technics. After bioactive fraction selection against *C. scovillei*, it was purified
79 10 compounds in preparative chromatograph by HPLC analyze were used in new bioassays.
80 The extract of *P. marginatum* showed promise in controlling this pathogen from 1000 ppm.
81 The ethyl acetate and methanol fractions of this extract showed a much higher efficiency than
82 the crude extract, and the compound 12 inhibited the mycelial growth from 1.5 ppm, being
83 more efficient than the mancozeb fungicide.

84

85 **Index terms:** *Capsicum annuum*, antracnose, alternative control, *Piper marginatum*,
86 *Azadirachta indica*.

87

88 **Introdução**

89 O pimentão (*Capsicum annuum* L.) é uma das mais importantes hortaliças cultivadas
90 no Brasil. É utilizado na indústria alimentícia para produção de pigmentos, consumido *in*
91 *natura*, no processamento de molhos, temperos e conservas, e por este motivo torna-se a cada
92 dia uma cultura que vem crescendo no Brasil e no Mundo (Reifschneider & Ribeiro, 2004).

93 A antracnose é considerada uma das mais importantes doenças do pimentão a nível
94 mundial. Os agentes causais desta doença são os fungos pertencentes ao gênero
95 *Colletotrichum*, tais como *C. gloeosporioides* (Penz.) Penz. e Sacc, *C. capsici* (H.Syd.) E.
96 Butl. E Bisby, *C. dematium* (Persoon) Grove, *C. coccodes* (Wallroth) Hughes, *C.*
97 *acutatum* Simmonds (Azevedo et al., 2006) e *C. scovillei* Damm (Damm et al., 2012). Estes
98 patógenos causam antracnose em pré-colheita e como também estão associados a infecções
99 quiescentes e períodos assintomáticos que levam a grandes perdas pós-colheita de frutas e
100 hortaliças (Prusky & Plubley, 1992).

101 A semelhança entre caracteres morfológicos é um grande obstáculo frente à
102 identificação de espécies do gênero *Colletotrichum*. Apesar desta dificuldade, têm-se obtido
103 avanços na identificação precisa dos fungos deste gênero, com base em estudos conjuntos
104 com base fisiológica, patogênicos e moleculares.

105 Visando o controle da antracnose, algumas medidas integradas são recomendadas,
106 como a utilização de sementes sadias; realização do plantio em épocas secas; redução do
107 adensamento no plantio; evitar irrigação por aspersão; evitar plantio de outras espécies
108 hospedeiras; embalar os frutos colhidos, apenas, quando estiverem secos; expor os frutos para
109 comercialização em locais arejados (Lopes & Ávila, 2004). Entretanto, apesar de todo manejo
110 que pode ser realizado, a aplicação de produtos químicos continua sendo o método mais
111 difundido. Por este motivo, os níveis de resíduos de agrotóxicos em pimentão *in natura*,
112 atualmente, é um dos mais elevados, com aproximadamente 92% (Anvisa, 2010).

113 Com base na necessidade da utilização de métodos mais seguros, eficientes,
114 econômicos e que não sejam poluentes têm-se estimulado e intensificado a busca por métodos
115 alternativos de controle de doenças de plantas cultivadas por meio do uso de extratos vegetais
116 (Stangarlin et al., 1999).

117 Um grande número de plantas apresenta propriedades antifúngicas em seus extratos e
118 este fato tem despertado grande interesse para o controle de doenças por representarem uma
119 fonte importante de substâncias com potencial ação antimicrobiana (Ammar; Nenaah; Hamed,
120 2013; Bandeira et al., 2013; Perini et al., 2013; Veloz-García et al., 2010; Vogt et al., 2013).
121 Entretanto, essas propriedades são dependentes de uma série de fatores inerentes às plantas,
122 como órgãos utilizados, idade e estágio vegetativo, bem como a espécie da planta e do
123 fitopatógeno envolvido, o tipo de doença a ser controlada e os processos tecnológicos
124 utilizados na obtenção e manipulação do extrato (Silva et al., 2005).

125 O controle sobre fungos pode ocorrer tanto pela ação fungitóxica direta através da
126 inibição do crescimento micelial e germinação de esporos, quanto pela indução de
127 fitoalexinas, indicando a presença de composto (s) com característica (s) de eliciador (es)
128 (Stangarlin et al., 1999).

129 Extratos de diversas espécies vegetais, como: hortelã (*Mentha piperita* L. *citrata*
130 (Ehrh.) Briq.) (Rozwalka et al., 2008), alho (*Allium sativum* L.) e canela
131 (*Cinnamomum zeylanicum* Garcin ex Blume) (Viegas et al., 2005), capeba (*Piper marginatum*
132 Jacq.) (Reigada, 2009) e nim (*Azadirachta indica* A. Juss.) (Silva et al., 2012), tem
133 demonstrado potencial contra fungos fitopatogênicos.

134 Diante disto, o presente trabalho objetivou investigar extratos vegetais brutos de *Piper*
135 *marginatum* (folhas) e *Azadirachta indica* (folhas e sementes) sob *Colletotrichum scovillei* *in*
136 *vitro*; avaliar frações e compostos puros de *P. marginatum* comparando com o efeito com a
137 utilização do fungicida mancozeb no controle da antracnose *in vitro* e em pós-colheita no
138 controle *in vitro* de *C. scovillei*.

Material e métodos

Preparo, caracterização e quantificação de extratos vegetais

Foram utilizadas para o preparo dos extratos: *Piper marginatum* Jacq. (capeba) e *Azadirachta indica* A. Juss (nim). Foram utilizadas as folhas de capeba e as folhas e sementes de nim. As folhas de *P. marginatum* foram coletadas na Universidade Federal Rural de Pernambuco (8°00'55.018"S 34°56'49.874"W). A identificação da espécie *P. marginatum* foi realizada por Dra. Elsie Franklin Guimarães do Jardim Botânico do Rio de Janeiro-RJ, e um exemplar desta espécie (exsicata) encontra-se depositado no Herbário deste Instituto, catalogado e registrado sob nº 575.356. As folhas e sementes de *A. indica* foram cedidas pela Empresa Cruangi Nim do Brasil LTDA, Timbaúba, PE. Os materiais vegetais foram desidratados em estufa a 40°C por um período de 48 a 72 horas, sendo posteriormente triturados e armazenados separadamente em sacos de papel. A extração, fracionamento e análise cromatográfica dos extratos obtidos foram realizados nos Laboratórios de Fitoquímica e Processos (LAFIP) e Central Analítica do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE).

Aproximadamente 600 g do material seco e triturado de cada espécie, foram obtidas por extração acelerada de solvente (ASE 350, Dionex Corporation®) a 40°C com metanol (MeOH), a uma pressão entre 1500 e 1700 psi. Após extração o solvente foi removido sobre pressão reduzida com rotação em banho-maria (50°C) (Evaporador rotativo IKA HB10 digital). Realizou-se também a extração do material vegetal com hexano (C₆H₁₄) sobre as mesmas condições já descritas anteriormente.

O fracionamento do extrato por cromatografia em coluna aberta foi realizado utilizando-se sílica gel 60 (70-230 mesh - MACHEREY-NAGEL), como fase estacionária. Como eluentes (fase móvel) foi utilizado gradiente de solventes na seguinte ordem: HEX; HEX/acetato de etila (EtOAc) (1:1 v/v); EtOAc; MeOH/EtOAc (1:1 v/v), MeOH. As frações foram coletadas separadamente e concentradas em evaporador rotativo, pesadas e armazenadas em frascos tipo âmbar e hermeticamente fechados. Posteriormente, as frações foram avaliadas quanto a capacidade antifúngica.

Análise cromatográfica dos extratos obtidos

A separação dos compostos foi realizada através de Cromatógrafo semipreparativo (Waters, modelo EF1525, com detector UV Waters 1489 com coluna C18 (21,2 x 150 mm, 5 µm), com fase móvel de Acetonitrila (pureza HPLC), com um fluxo de 10ml/min, num tempo

173 de 10 min e temperatura de 35° C. O Fracionamento por tempo (31 segundos por fração) e
174 injetado 5mg a partir de 2 minutos resultou em 30 frações. Após este fracionamento,
175 eventuais resíduos foram retirados da coluna com uma fase móvel de AcN/EtOAc (50:50%,
176 v/v (pureza HPLC) durante 5 minutos. Foram inseridas 5 injeções, cada uma de 0,5ml
177 totalizando 2,5 ml de extrato injetado.

178 As frações obtidas foram pesadas e verificou-se que apenas 10 delas apresentavam
179 massa acima de 0,5 mg, sendo elas as frações 7, 9, 12, 13, 15, 17, 18, 20, 21, 23, 29. Estas
180 frações foram utilizadas em novos testes biológicos.

181

182 **Efeito dos extratos metanólico, hexânico de *P. marginatum* e *A. indica* e das frações de *P.*** 183 ***marginatum* na inibição do crescimento micelial de *Colletotrichum scovillei* in vitro**

184 Para testar a atividade antifúngica dos extratos metanólico e hexânico de folha de *A.*
185 *indica* (FN), semente de *A. indica* (SN) e folha de *P. marginatum* (FP) sobre o crescimento
186 micelial de *C. scovillei*, cada uma das concentrações de cada extrato (0, 125, 250, 500, 1000 e
187 2000 ppm) foi incorporada separadamente em 150 mL de BDA a 45°C (fundente) e vertida
188 em placas de Petri. Os extratos antes de incorporados ao meio foram sempre filtrados em
189 filtro para seringa (0,45 µm PVDF CHROMAFIL®). O fungicida mancozeb na concentração
190 recomendada pelo fabricante (2,5 mg mL⁻¹) foi testado como controle positivo nos
191 experimentos. Posteriormente, cada placa recebeu um disco de 0,5 cm de diâmetro de meio
192 BDA contendo estruturas do patógeno, na parte central. As placas repicadas foram mantidas a
193 28±2°C, sob fotoperíodo de 12 horas. O crescimento fúngico foi avaliado quando o micélio
194 presente na testemunha atingiu o diâmetro máximo da placa de Petri (9 cm). A avaliação
195 consistiu na medição do crescimento radial da colônia, em dois eixos ortogonais, sendo
196 posteriormente calculada uma média por placa. Foram determinados o crescimento micelial e
197 a porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC). A porcentagem de inibição do
198 crescimento (PIC) da colônia fúngica foi calculada por meio da fórmula: PIC = [(diâmetro da
199 testemunha - diâmetro do tratamento) /diâmetro da testemunha] x 100, para cada tratamento
200 em relação à testemunha (MACAGNAN, 2001).

201 Experimentos preliminares foram realizados com os solventes MeOH, HEX, EtOAc e
202 AcN objetivando analisar se estes afetariam o desenvolvimento de *C. scovillei* nos bioensaios.

203 Depois de identificada a espécie vegetal mais eficiente contra *C. scovillei* in vitro,
204 novos bioensaios foram realizados utilizando frações obtidas por cromatografia em coluna
205 aberta (frações: HEX/EtOAc, EtOAc, EtOAc/MeOH e MeOH). A fração que obteve maior

206 bioatividade foi fracionada em HPLC semipreparativo, seguido por novos bioensaios das
207 frações obtidas (compostos puros).

208 Para a construção dos gráficos e cálculo do IC₅₀ (Concentração Inibitória para 50% do
209 crescimento micelial), no intervalo de 95% (intervalo de confiança de 95%) foram calculados
210 utilizando uma curva de regressão não linear através do Programa GraphPad Prism 4.00,
211 GraphPad Software (San Diego, CA).

212 Todos os experimentos foram realizados em duplicata. Os dados analisados foram
213 submetidos à análise de variância, e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 1% de
214 probabilidade. As análises foram realizadas utilizando-se o programa computacional
215 ASSISTAT Versão 7.6 beta (Silva & Azevedo 2009).

216

217 **Efeito de frações do extrato metanólico de *Piper marginatum* no controle de** 218 ***Colletotrichum scovillei* em pós-colheita de pimentão**

219 Foram realizados ferimentos em frutos de pimentão, previamente desinfestados de
220 acordo com Menezes e Assis (2004). Posteriormente as frações de *P. marginatum* foram
221 inoculadas na concentração de 50 µl/fruto. Duas horas após a inoculação dos tratamentos, os
222 frutos foram inoculados com 50 µl da suspensão de conídios de *C. scovillei* na concentração
223 de 1×10^6 conídios/mL⁻¹. Como testemunhas foram utilizados frutos desinfestados
224 superficialmente e tratados com ADE e frutos desinfestados superficialmente sem tratamentos
225 de extratos e inoculados com o fitopatógeno. Em cada bandeja foram colocados quatro frutos,
226 equidistantes entre si, sendo cada fruto considerado uma repetição. As bandejas foram
227 colocadas em sacos plásticos em câmara úmida e mantidas em temperatura ambiente
228 (26°C±2°C).

229 A avaliação foi realizada sete dias após a inoculação, onde foram determinados o
230 crescimento micelial e a porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC). A
231 porcentagem de inibição do crescimento (PIC) da colônia fúngica foi calculada por meio da
232 fórmula: $PIC = [(diâmetro da testemunha - diâmetro do tratamento) / diâmetro da testemunha]$
233 $\times 100$, para cada tratamento em relação à testemunha (Macagnan, 2001).

234 Os experimentos foram repetidos duas vezes. O delineamento adotado foi inteiramente
235 casualizado com quatro repetições, sendo cada repetição representada por um fruto e os
236 tratamentos pelas bandejas plásticas. Os resultados foram submetidos à análise de variância e
237 as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 1% de probabilidade, utilizando-se o
238 programa ASSISTAT Versão 7.6 beta (Silva & Azevedo 2009).

239

Resultados e Discussão

240

241

242 Obteve-se com relação aos extratos metanólicos secos, 23,0 g de folha de *P.*
243 *marginatum*, 35,0 g de folha e 16,0 g de semente de *A. indica* e. Todos os extratos foram
244 concentrados e armazenados em metanol (MeOH) em -18°C até o uso. E com relação aos
245 extratos hexânicos, obteve-se: 67,5 mg de folha e 822,3 mg de semente de *A. indica* e 288,9
246 mg de *P. marginatum*, mantendo-se armazenado da mesma forma dos extratos metanólicos.

247

248 Com relação ao desenvolvimento de *C. scovillei* mensurado através do crescimento
249 micelial, houve diferença significativa ($p < 0,01$) entre os extratos metanólicos testados na
250 maioria das concentrações, porém o extrato metanólico de *P. marginatum* apresentou menores
251 diâmetros da colônia, como pode-se observar na Figura 1. Os extratos metanólicos de folha e
252 semente de *A. indica* nas concentrações 125, 250 e 500 ppm não diferiram da testemunha (0
253 ppm), nas demais concentrações testadas, chegaram a exercer influência sobre o crescimento
254 micelial do fungo, diferindo da testemunha, porém bem inferiores que o extrato de *P.*
255 *marginatum* como pode-se observar na Figura 1. Apenas a menor concentração testada do
256 extrato de *P. marginatum* não foi capaz de inibir o desenvolvimento do patógeno *C. scovillei*.
257 Nas concentrações a partir de 250 ppm, *P. marginatum* reduziu o crescimento do
258 fitopatógeno, sendo 1000 ppm (53,75% de inibição do crescimento micelial) considerada uma
259 dosagem de referência para a realização dos bioensaios subsequentes, por ter reduzido mais
260 de 50% o desenvolvimento de *C. scovillei* (Figura 2). Quanto maior a dosagem dos extratos
261 testados, maior foi a porcentagem de inibição do crescimento micelial (Figura 2). Apesar de
262 diferir estatisticamente da testemunha, os extratos de folha e semente de *A. indica*, não
263 conseguiram apresentar um nível de inibição significativo como o extrato de *P. marginatum*.

263

264 A Concentração Inibitória dos extratos metanólicos capaz de inibir 50% do
265 crescimento micelial (IC_{50}) de *C. scovillei* foram $0,4151 \text{ mg mL}^{-1}$ ($R^2 = 0,86$); $0,7191 \text{ mg mL}^{-1}$
266 ($R^2 = 0,99$) e $0,6617 \text{ mg mL}^{-1}$ ($R^2 = 0,97$) para *P. marginatum*, *A. indica* (folha) e *A. indica*
(semente), respectivamente..

267

268 Enquanto os extratos metanólicos de *P. marginatum* a partir de 250 ppm já reduziram
269 o crescimento micelial de *C. scovillei*, com relação ao extrato hexânico de *P. marginatum*
270 apenas a maior concentração (2000 ppm) foi eficaz contra o fitopatógeno (Tabela 1).
271 Nenhuma das concentrações testadas dos extratos hexânicos de *A. indica* (folha e semente)
272 foram eficientes contra *C. scovillei in vitro*, enquanto que o extrato metanólico (folha) a partir
273 da concentração de 1000 ppm e o extrato metanólico (semente) de *A. indica* a partir de 500
ppm obtiveram êxito no controle *in vitro* (Tabela 1).

274 Vários autores tem descrito utilização de extratos vegetais de espécies do gênero *Piper*
275 *in vitro*, contra diversos fitopatógenos: *Piper betle* L. contra *Colletotrichum falcatum* Went.
276 (Prince & Prabakaran, 2011); *P. chaba* Hunter contra *Fusarium oxysporum* Kühn,
277 *Phytophthora capsici* Leonian., *C. capsici*, *F. solani* (Mart.) Sacc. e *R hizoctonia solani*
278 Kuhn (Rahman & Kang, 2011); *Piper auritum* Kunth e *Piper holtonii* C. DC. contra *C.*
279 *acutatum* J. H. Simmonds (1968), *C. gloeosporioides* (Penz.) Penz. and Sacc e *B. theobromae*
280 (Pineda et al., 2012).

281 Da mesma forma que espécies de *Piper*, também existem alguns trabalhos relatados na
282 literatura utilizando *A. indica* no controle de fitopatógenos *in vitro*, a exemplo de: *Fusarium*
283 *oxysporum* Schlechtendal, *Rizocthonía solani* Kuhn, *Alternaria solani* Sorauer e *Sclerotinia*
284 *sclerotiorum* (Liberty) de Bary. (El-Kholie et al., 2012); extrato de semente de *A. indica*
285 contra fungos pós-colheita em ameixa *Monilinia fructicola* (G. Wint.) Honey, *Penicillium*
286 *expansum* (Link.) Thom, *Trichothecium roseum* (Pers.) Link, *Alternaria alternata* (Fries)
287 Keissler (Wang et al., 2010); contra *C. dematium* (Pers. ex Fr.) Grove e *F. solani*
288 (Bhanumathi & Rai, 2007), entre outros.

289 Entretanto, outros estudos demonstram que *A. indica* não obtêm resultados
290 satisfatórios, como verificado em relação a: *C. acutatum* (Almeida et al., 2009); *Aspergillus*
291 sp., *Penicillium* sp., *C. kikuchii*, *Colletotrichum* sp., *F. solani* e *Phomopsis* sp. (Venturoso et
292 al., 2011); *C. gloeosporioides* (Silva et al., 2012). Estes resultados corroboram com os obtidos
293 no presente trabalho, em que os extratos de *A. indica* não foram tão expressivos no controle
294 de *C. scovillei*.

295 Estudos com outras espécies de *Piper* comprovam a ocorrência de diferentes classes
296 de compostos apresentando propriedades antifúngicas, sendo estes os principais responsáveis
297 pela ação antimicrobiana destas espécies. Reigada (2009) identificou compostos inéditos
298 provenientes de *P. marginatum*, o fenilpropanóide marginatumol; os policetídeos alatanona A
299 e B; o secolignana peperomina G e verificou que todos os metabólicos isolados apresentaram
300 potencial atividade antifúngica, sendo os policetídeos alatanona A e B os mais ativos.

301 Na cromatografia de coluna aberta foi inserido 170 mg do extrato de *P. marginatum* e
302 obteve-se 93,2 mg da fração HEX/EtOAc, 5,66 mg da fração EtOAc, 42,6 mg da fração
303 EtOAc/MeOH e 27,2 mg da fração MeOH. Desta quantidade obtida de frações, utilizou-se: 24
304 mg da fração HEX/EtOAc; 103 µg fração EtOAc; 5 mg fração EtOAc/MeOH e 2 mg da
305 fração MeOH, para realização dos antifungigramas.

306 As frações que melhor controlaram *C. scovillei in vitro* foram EtOAc/MeOH e MeOH,
307 0,89 e 0,96 cm para crescimento micelial e 89,56 e 88,68% de PIC do fitopatógeno,

308 respectivamente (Tabela 2). Entretanto, ressalta-se que a quantidade da fração EtOAc (103
309 μg) utilizada neste experimento foi muito inferior às quantidades utilizadas das outras frações,
310 como mencionado anteriormente, desta forma, considerou-se bioativa a fração EtOAc.

311 No controle de *C. scovillei* em pós-colheita as quatro frações de *P. marginatum*
312 testadas foram eficientes no controle da antracnose, diferindo da testemunha (Tabela 3). A
313 fração EtOAc, apresentou 58,73% de PIDL, resultado este que demonstra novamente a
314 importância desta fração no controle deste fitopatógeno, já que a mesma foi utilizada em
315 quantidades inferiores às demais frações. De acordo com Young (2000), quase sempre, as
316 substâncias com atividade de interesse estão presentes em quantidades mínimas na planta.

317 Realizou-se a separação dos compostos da fração EtOAc em Cromatógrafo
318 semipreparativo (HPLC), sendo obtidas Todas as frações testadas diferiram estatisticamente da
319 testemunha, entretanto a fração 12 foi significativamente mais eficiente que as demais, tendo
320 sido observado um crescimento micelial *in vitro* de 1,50 cm e 82,43% de PIC, resultado
321 similar ao verificado no teste pós-colheita, em que verificou-se a mesma fração com melhores
322 resultados, 0,44 cm de crescimento micelial e 81,25% de PIDL, como pode-se observar na
323 Tabela 4.

324 Apesar dos estudos voltados à pesquisa de plantas e identificação de metabólitos
325 isolados visando o controle de micro-organismos, não se faz relação direta com a
326 quantificação destes compostos. Isto é, sabe-se que uma gama de compostos são bioativos,
327 porém não se conhece o quanto deste é necessário para inibir o desenvolvimento dos
328 patógenos. A grande dificuldade encontrada na busca de compostos isolados é a quantidade
329 de amostra necessária para realização dos bioensaios, desta forma, em sua grande maioria, os
330 trabalhos são realizados com técnicas biospectroscópicas qualitativas, que identificam apenas
331 quais compostos foram bioativos, porém não conseguem quantificá-los (Silva, 2011).

332 O fungicida mancozeb na dosagem recomendada pelo fabricante ($2,5 \text{ mg mL}^{-1}$) não
333 reduziu totalmente o crescimento micelial deste fitopatógeno, *in vitro* e em pós-colheita
334 (Tabela 4).

335 Como a dosagem do fungicida recomendada não isenta o desenvolvimento de
336 *Colletotrichum scovillei in vitro*, como resultados verificados neste trabalho, talvez, no
337 campo, a situação frente ao fitopatógeno seja ainda pior. E relacionando estes dados aos
338 recentes índices de resíduos de agrotóxicos em alimentos, fica evidente o motivo pelo qual o
339 pimentão é considerado o primeiro na lista de resíduos, com índices que chegam a 92%.

340 Apesar da existência de diversas medidas que podem ser utilizadas integradas para o
341 controle da antracnose do pimentão, a aplicação de produtos químicos continua sendo a

342 tecnologia mais utilizada no Brasil, gerando altos índices de contaminações de alimentos, bem
343 como ambiental, ao homem e animais. Estudos como este, voltados à bioprospecção geram
344 conhecimento da biodiversidade e seu potencial e fornecem dados sobre substâncias que
345 podem substituir os produtos químicos e desenvolver novos compostos bioativos.

346

347

Conclusões

348

- 349 1. O extrato metanólico de folhas de *P. marginatum* foi eficiente na inibição de crescimento
350 micelial a partir de 250 ppm sob *C. scovillei in vitro*;
- 351 2. O extrato metanólico de folhas de *A. indica* nas concentrações de 1000 e 2000 ppm
352 inibiram o crescimento micelial de *C. scovillei in vitro*;
- 353 3. Extrato metanólico de sementes de *A. indica* inibiram o crescimento micelial de *C.*
354 *scovillei* a partir da concentração de 500 ppm;
- 355 4. Dentre os extratos metanólicos testados, o mais eficiente no controle de *C. scovillei in*
356 *vitro* foi o de *P. marginatum*;
- 357 5. Os extratos hexânicos de *A. indica* não foram eficientes no controle do fitopatógeno;
- 358 6. O extrato hexânico de *P. marginatum* a 2000 ppm foi eficiente no controle do
359 fitopatógeno;
- 360 7. A fração acetato de etila do extrato metanólico de *P. marginatum* foi a mais eficaz no
361 controle de *C. scovillei*;
- 362 8. O composto 12, obtido por HPLC semipreparativo, foi capaz de reduzir em 82% o
363 crescimento do fitopatógeno em concentração de 1,5 ppm;
- 364 9. O composto 12 foi mais eficiente que o fungicida mancozeb no controle *in vitro* e pós-
365 colheita de *C. scovillei*.

366

367

368

Agradecimentos

369

370 Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela
371 concessão da bolsa de estudo. À Profa. Dra. Elsie Franklin Guimaraes, do Herbário do Jardim
372 Botânico do Rio de Janeiro-RJ, pela disponibilidade em confirmar identificação botânica da
373 espécie vegetal utilizada neste estudo.

374

Referências

- 375
376
377 ALMEIDA, T.F.; CAMARGO, M.; PANIZZI, R.C. Efeito de extratos de plantas medicinais
378 no controle de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da flor preta do morangueiro. **Summa**
379 **Phytopathologica**, v.35, n.3, p.196-201, 2009.
380
381 AMMAR, M.I.; NENAAB, G.E.; HAMED, A.H.M. Antifungal activity of prenylated
382 flavonoids isolated from *Tephrosia apollinea* L. against four phytopathogenic fungi. **Crop**
383 **Protection**, v.49, p.21–25, 2013.
384
385 ANVISA. **Toxicologia**. Relatório ano 2010 Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
386 Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/para>>. Acesso em 17 jul. 2010.
387
388 AZEVEDO, C.P.; HENZ, G.P.; CAFÉ FILHO, A.C.; REIS, A. **Recomendações de manejo**
389 **da antracnose do pimentão e das pimentas**. Brasília: EMBRAPA HORTALIÇAS, 2006
390 (Comunicado Técnico (EMBRAPA)).
391
392 BANDEIRA, R.A.; LIMA, R.A. Efeito do extrato etanólico dos frutos de *Solanum*
393 *grandiflorum* Ruiz sobre *Fusarium oxysporum* Kühn in vitro. **Saúde e Pesquisa**, v.6, n.1,
394 p.69-73, 2013.
395
396 BHANUMATHI, A.; RAI, V.R. Leaf blight of *Azadirachta indica* and its management *in*
397 *vitro*. **African Journal of Agricultural Research**, v.2, n.10, p.538 -543, 2007.
398
399 DAMM. U.; CANNON P.F.; WOUDEBERG J.H.C.; CROUS, P.W. The *Colletotrichum*
400 *acutatum* species complex. **Studies in Mycology**, v.73, p.37-113, 2012.
401
402 EL-KHOLIE, E.M.; ABDELREHEEM, M.A.T.; KHADER, S. *Azadirachta indica* extracts
403 influenced some pathogenic fungi. **African Journal of Microbiology Research**, v.6, n.27,
404 p.5645-5649, 2012.
405
406 LOPES, C.A.; ÁVILA, A.C. **Doenças do pimentão: diagnose e controle**. Brasília, DF:
407 Embrapa Hortaliças, 2003. 96 p.
408

- 409 MACAGNAN D. **Seleção de procariotas residentes de filoplano visando o biocontrole da**
410 **vassoura-de-bruxa do cacauero (*Theobroma cacao* L.) incitada por *Crinipellis pernicioso***
411 **(STAHEL) SINGER. 2001. 57 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.**
412
- 413 PERINI, V.B.M.; CASTRO, H.G.; SANTOS, G.R.; CHAGAS JÚNIOR, A.F.; CARDOSO,
414 D.P.; AGUIAR, R.W.S.; SOARES, A.A. Effect of vegetal extract in the inhibition of mycelial
415 growth of *Pyricularia grisea*. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v.4, n.1, p.70-77,
416 2013.
- 417
- 418 PINEDA, M. R.; VIZCAÍNO, P. S.; GARCÍA, P. C. M.; GIL, J. H.; DURANGO, R. D. L.
419 Chemical composition and antifungal activity of *Piper auritum* Kunth and *Piper holtonii* C.
420 DC. against phytopathogenic fungi. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v.72, n.4,
421 p.507-515, 2012.
- 422
- 423 PRINCE, L.; PRABAKARAN, P. Antifungal activity of medicinal plants against planta
424 pathogenic fungus *Colletotrichum falcatum*. **Asian Journal of Plant Science and Research**,
425 v.1, n.1, p.84-87, 2011.
- 426
- 427 PRUSKY, D; PLUMBLEY, R. Quiescent infections of *Colletotrichum* in tropical and
428 subtropical fruits. In. CAB International, 1992. pp. 289-307,
429
- 430 RAHMAN, A.; AL-REZA, S.M. Antifungal activity of essential oil and extracts of *Piper*
431 *chaba* Hunter against phytopathogenic fungi. **Journal of the American Oil Chemists**
432 **Society**, v.88, p.573–579, 2011.
- 433
- 434 REIFSCHNEIDER, F.J.B.; RIBEIRO C.S.C. **Introdução e importância econômica.**
435 Brasília: Embrapa Hortaliças, 2004. Disponível em:
436 <<http://www.cnph.embrapa.br/sistprod/pimenta/index.htm>> Acesso em: 05 Jul. 2010.
- 437
- 438 REIGADA, J.B.; TCACENCO, C.M.; ANDRADE, L.H.; KATO, M.J.; PORTO, A.L.M;
439 LAGO, J.H.G. Chemical constituents from *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae) - antifungal
440 activities and kinetic resolution of (RS)-marginatumol by *Candida antarctica* lipase (Novozym
441 435). **Tetrahedron: Asymmetry**, v.18, p.1054–1058, 2007.
- 442

- 443 ROZWALKA, L. C.; LIMA, M. L. R. Z. C.; MIO, L. L. M.; NAKASHIMA, T. Extratos,
444 decoctos e óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas na inibição de *Glomerella*
445 *cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides* de frutos de goiaba. **Ciência Rural**, v.38, n.2,
446 p.301-307, 2008.
- 447
- 448 SILVA, J.L.; TEIXEIRA, R.N.V.; SANTOS, D.I.P.; PESSOA, J.O. Atividade antifúngica de
449 extratos vegetais sobre o crescimento in vitro de fitopatógenos. **Revista Verde**, v.7, n.1, p.80-
450 86, 2012.
- 451
- 452 SILVA, R.A. **Análise metabolômica e atividade biológica de *Piper reticulatum* L.** 2011.
453 150p. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Paulo 2011, 150f
- 454
- 455 SILVA, F.A.Z.; AZEVEDO, C.A.V. **Principal Components Analysis in the Software**
456 **Assistat-Statistical Attendance**. In: World Congress on Computers in Agriculture, 7, Reno-
457 NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.
- 458
- 459 SILVA, M.B.; ROSA, M.B.; BRASILEIRO, B.G.; ALMEIDA, V.; SILVA, C.A.
460 Desenvolvimento de produtos à base de extratos de plantas para o controle de doenças de
461 plantas. In: VENEZON, M.; PAULA JÚNIOR, T.J.; PALLINI, A. (Eds.). **Controle**
462 **alternativo de pragas e doenças**. Viçosa, MG: EPAMIG/CTZM, 2005. p.221-246.
- 463
- 464 STANGARLIN, J.R.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.; CRUZ, M.S.; NOZAKI, M.H. Plantas
465 medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. **Biotecnologia Ciência e**
466 **Desenvolvimento**, v.11, p.16-21, 1999.
- 467
- 468 VELOZ-GARCÍA, R.; MARÍN-MARTÍNEZ, R.; VELOZ-RODRÍGUEZ, R.; RODRÍGUEZ-
469 GUERRA, R.; TORRES-PACHECO, I.; GONZÁLEZ-CHAVIRA, M.M.; ANAYA-LÓPEZ,
470 J.L.; GUEVARA-OLVERA, L.; FERREGRINO-PÉREZ, A.A.; LOARCA-PIÑA, G.;
471 GUEVARA-GONZÁLEZ, R.G. Antimicrobial activities of cascalote (*Caesalpinia cacalaco*)
472 phenolics-containing extract against fungus *Colletotrichum lindemuthianum*. **Ind. Crops**
473 **Prod**, v.31, p.134–138, 2010
- 474

- 475 VENTUROSO, L.R.; BACCHI, L.M.A.; GAVASSONI, W.L. Atividade antifúngica de
476 extratos vegetais sobre o desenvolvimento de fitopatógenos. **Summa Phytopathologica**,
477 v.37, n.1, p.18-23, 2011.
478
- 479 VIEGAS, E.C.; SOARES, A.; CARMO, M.G.F.; ROSSETTO, C.A.V. Toxicidade de óleos
480 essenciais de alho e casca de canela contra fungos do grupo *Aspergillus flavus*. **Horticultura**
481 **Brasileira**, v.23, n.4, p.915-919, 2005.
482
- 483 VOGT, V.; CIFUENTE, D.; TONN, C.; SABINI, L.; ROSAS, S. Antifungal activity *in*
484 *vitro* and *in vivo* of extracts and lignans isolated from *Larrea divaricata* Cav. against
485 phytopathogenic fungus. **Industrial Crops and Products**, v.42, p.583–586, 2013.
486
- 487 WANG, J.; CAO, J.L.J.; JIANG, W. Antifungal activities of neem (*Azadirachta indica*) seed
488 kernel extracts on postharvest diseases in fruits. **African Journal of Microbiology Research**,
489 v.4, n.11, p.1100-1104, 2010.
490
- 491 YOUNG, M.C.M. REVISTA FAPESP. **Novos medicamentos das matas**. São Paulo:
492 Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), 2000. 51 ed. Disponível
493 em: <<http://revistapesquisa.fapesp.br/2000/03/01/novos-medicamentos-das-matas/>>. Acesso
494 em 10 jul. 2013.
495

496 **Tabela 1.** Crescimento micelial de *Colletotrichum scovillei* em meio BDA contendo
 497 diferentes concentrações de extratos hexânicos⁽¹⁾.

Extratos Hexânicos	Crescimento micelial (cm)					
	0 ppm	125 ppm	250 ppm	500 ppm	1000 ppm	2000 ppm
<i>P. marginatum</i> (folha)	8,50 aA	8,50 aA	8,50 aA	8,50 aA	8,50 aA	5,21 bB
<i>A. indica</i> (folha)	8,50 aA	8,50 aA	8,50 aA	8,50 aA	8,50 aA	8,50 aA
<i>A. indica</i> (semente)	8,50 aA	8,50 aA	8,50 aA	8,50 aA	8,50 aA	8,50 aA
CV (%)	2,20					

498 ¹⁾Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas não diferem estatisticamente
 499 entre si pelo teste de Scott-Knott a 1% de probabilidade.

500

501 **Tabela 2.** Crescimento micelial (CM) e porcentagem de inibição do crescimento micelial
 502 (PIC) de *Colletotrichum scovillei in vitro* por frações do extrato metanólico de *Piper*
 503 *marginatum*⁽¹⁾.

Frações extrato metanólico	Peso (mg)	Concentração (mg mL ⁻¹)	CM (cm)	PIC (%)
Testemunha	0,000	0,0000	8,00 a	-
HEX/EtOAc	24,000	0,5526	1,76 b	79,26 c
EtOAc	0,103	0,0360	1,56 c	81,62 b
EtOAc/MeOH	5,000	0,2526	0,89 d	89,56 a
MeOH	2,000	0,1612	0,96 d	88,68 a
CV (%)	3,7			2,63

504 ⁽¹⁾As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Scott-Knott
 505 ao nível de 1% de probabilidade.

506

507 **Tabela 3.** Diâmetro da lesão em frutos de pimentão (cm) e porcentagem de inibição do
 508 diâmetro da lesão (PIDL) de *Colletotrichum scovillei* por frações do extrato metanólico de
 509 *Piper marginatum*⁽¹⁾.

Fração	Concentração (mg mL ⁻¹)	Diâmetro da Lesão (cm)	PIDL (%)
Testemunha	0,0000	3,00 a	-
HEX/EtOAc	0,5526	1,43 b	52,5 b
EtOAc	0,0360	1,24 b	58,73 b
EtOAc/MeOH	0,2526	1,73 b	42,48 b
MeOH	0,1612	1,65 b	45,00 b
CV (%)	-	21,86	33,12

510 ⁽¹⁾As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Scott-Knott
 511 ao nível de 1% de probabilidade.

512

513 **Tabela 4.** Crescimento micelial (CM) e porcentagem de inibição do crescimento micelial
 514 (PIC) e porcentagem de inibição do diâmetro da lesão (PIDL) de *Colletotrichum scovillei* por
 515 frações de *Piper marginatum* e fungicida mancozeb *in vitro* e em pós-colheita⁽¹⁾.

Tratamento	Concentração (µg mL ⁻¹)	<i>In vitro</i>		Pós-colheita	
		CM (cm)	PIC (%)	CM (cm)	PIDL (%)
Testemunha	-	8,50 a	-	4,50 a	-
Fração EtOAc	1,5	8,50 a	-	4,50 a	-
Fração AcN/EtOAc	1,5	3,33 e	60,88 c	1,53 ef	59,5 bc
Fração 7	1,5	3,76 d	55,81 cd	1,75 de	55,00 cd
Fração 9	1,5	4,45 c	47,65 ef	2,35 c	43,00 e
Fração 12	1,5	1,50 g	82,43 a	0,44 g	81,25 a
Fração 13	1,5	4,55 c	46,47 f	2,38 c	42,50 e
Fração 17	1,5	4,55 b	46,47 f	2,25 c	45,00 e
Fração 18	1,5	4,36 d	48,75 ef	2,19 c	46,25 e
Fração 20	1,5	4,63 c	45,51 f	2,24 c	45,25 e
Fração 21	1,5	4,03 c	52,65 de	1,90 d	52 d
Fração 23	1,5	4,39 c	48,38 ef	2,16 c	46,75 e
Fração 29	1,5	4,76 b	44,05 f	2,31 c	43,75 e
Fungicida mancozeb	2,5	2,59 f	69,56 b	1,38 f	62,50 b
CV (%)		5,39	7,08	4,11	4,20

516 ⁽¹⁾Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

517

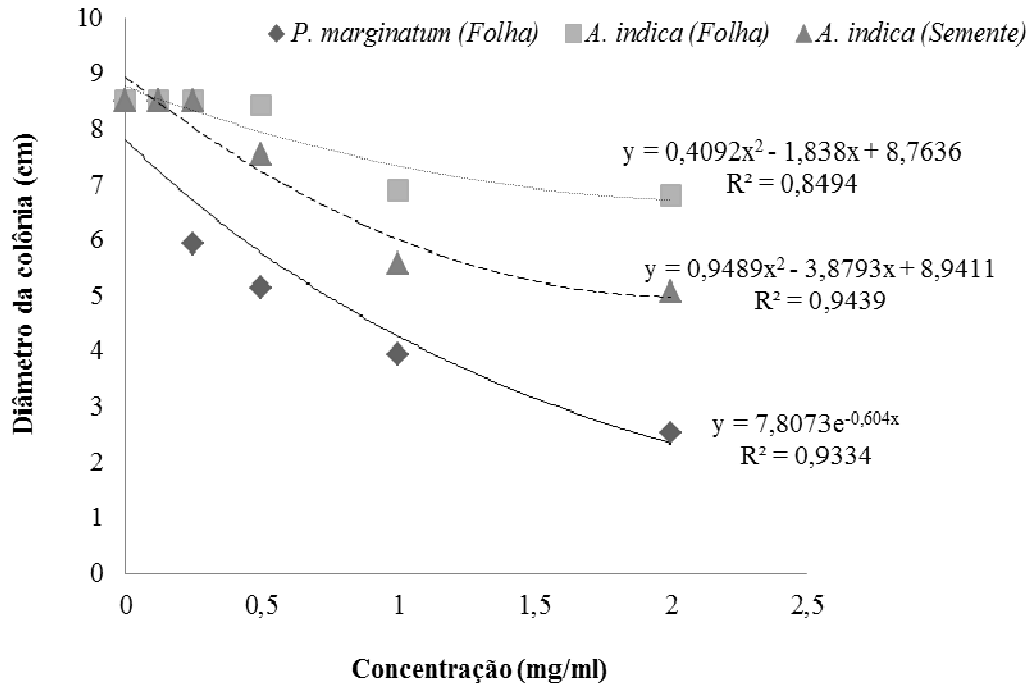


Figura 1. Efeito de diferentes concentrações de extratos metanólicos de *Piper marginatum* (folha), *Azadirachta indica* (folha) e *Azadirachta indica* (semente) sobre a porcentagem de inibição de crescimento micelial (PIC) de *Colletotrichum scovillei* in vitro ($P < 0,01$).

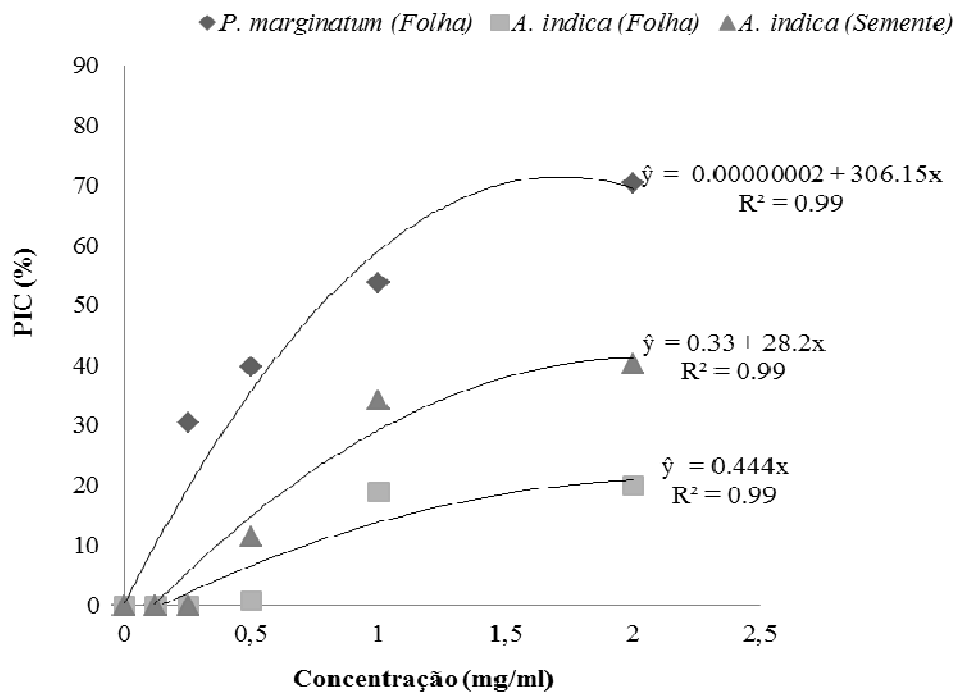


Figura 2. Efeito de diferentes concentrações de extratos metanólicos de *Piper marginatum* (folha), *Azadirachta indica* (folha) e *Azadirachta indica* (semente) sobre o crescimento micelial (diâmetro da colônia) de *Colletotrichum scovillei* in vitro ($P < 0,01$).

CONCLUSÕES GERAIS



CONCLUSÕES GERAIS

- O isolado mais agressivo selecionado no teste de patogenicidade foi identificado como sendo *Colletotrichum scovillei*, um dos agentes causais da antracnose em frutos de pimentão;
- As leveduras *R. mucilaginosa* (L6), *Candida duobushaemulonii* sp. nov. (L15) e *Candida natalensis* (CG27) foram capazes de reduzir o diâmetro da lesão, porcentagem de inibição do tamanho da lesão em pós-colheita de frutos de pimentão e crescimento micelial *in vitro* de *Colletotrichum scovillei*;
- A levedura *Candida natalensis* (CG27) reduziu o tamanho da lesão ocasionada por *C. scovillei* em frutos de pimentão ainda na planta;
- As leveduras *Candida duobushaemulonii* sp. nov. (L15) e *Candida natalensis* (CG27) promoveram o crescimento das plantas de pimentão em relação a variável BFPA;
- O isolado *Candida natalensis* (CG27) promoveu maior biomassa seca da parte aérea de plantas de pimentão;
- O isolado *Candida duobushaemulonii* sp. nov. (L15) promoveu uma maior biomassa fresca e seca de raiz;
- A levedura *R. mucilaginosa* (L6) produziu toxinas *Killer*;
- Extrato metanólico de *P. marginatum* nas concentrações de 1000 e 2000ppm foram eficientes no controle de *Colletotrichum scovillei in vitro*;
- Apenas o extrato hexânico de *P. marginatum* a 2000 ppm foi eficiente no controle do fitopatógeno;
- Em fracionamento de extrato metanólico de *P. marginatum*, a fração acetato de etila em quantidades infimamente menores que as demais frações, controlou *C. scovillei in vitro*;

- O composto 12 demonstrou atividade antifúngica a *Colletotrichum scovillei in vitro* e em pós-colheita;
- O composto 12 foi mais eficiente que o fungicida mancozeb no controle *in vitro* e pós-colheita de *C. scovillei*;
- Leveduras e extratos de *Piper marginatum* mostraram-se eficazes no controle da antracnose do pimentão ocasionada por *Colletotrichum scovillei*.