

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS  
CAMPUS DE BOTUCATU

**CONTROLE DE *Guignardia citricarpa* E *Penicillium digitatum* EM LARANJA COM  
ÓLEOS ESSENCIAIS E AGENTES DE BIOCONTROLE**

**LILIANA PATRICIA VITAL DE MATTOS**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências  
Agronômicas da Unesp - Campus de Botucatu,  
para obtenção do título de Doutor em  
Agronomia (Proteção de Plantas).

BOTUCATU - SP  
Dezembro- 2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS  
CAMPUS DE BOTUCATU

**CONTROLE DE *Guignardia citricarpa* E *Penicillium digitatum* EM LARANJA COM  
ÓLEOS ESSENCIAIS E AGENTES DE BIOCONTROLE**

**LILIANA PATRICIA VITAL DE MATTOS**

Orientador: Prof. Dr. Wagner Bettiol

Tese apresentada à Faculdade de Ciências  
Agronômicas da Unesp - Câmpus de Botucatu,  
para obtenção do título de Doutor em  
Agronomia (Proteção de Plantas).

BOTUCATU - SP  
Dezembro – 2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

M444c Mattos, Liliana Patrícia Vital de, 1977-  
Controle de *Guignardia citricarpa* e *Penicillium digitatum* em laranja com óleos essenciais e agentes de biocontrole / Liliana Patrícia Vital de Mattos. - Botucatu : [s.n.], 2010.  
xii, 94 f. : il. color.; gráfs. color., tabs.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2010  
Orientador: Wagner Bettiol  
Inclui bibliografia.

1. Bolor verde. 2. Controle biológico. 3. Mancha preta. 4. Frutos cítricos. 5. Pós-colheita. I. Bettiol, Wagner. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônômicas. III. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS  
CAMPUS DE BOTUCATU

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

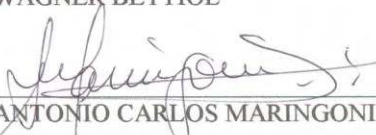
TÍTULO: "CONTROLE DE GUIGNARDIA CITRICARPA E PENICILLIUM DIGITATUM  
EM LARANJA PÓS-COLHEITA COM ÓLEOS ESSENCIAIS E AGENTES DE  
BIOCONTROLE".

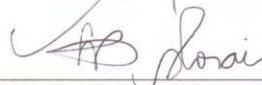
ALUNA: LILIANA PATRICIA VITAL DE MATTOS

ORIENTADOR: PROF. DR. WAGNER BETTIOL

Aprovado pela Comissão Examinadora

  
\_\_\_\_\_  
PROF. DR. WAGNER BETTIOL

  
\_\_\_\_\_  
PROF. DR. ANTONIO CARLOS MARINGONI

  
\_\_\_\_\_  
PROFª DRª LILIA APARECIDA SALGADO DE MORAIS

  
\_\_\_\_\_  
PROFª DRª ELIANE APARECIDA BENATO R. DA SILVA

  
\_\_\_\_\_  
PROF. DR. EDSON LUIZ FURTADO

Data da Realização: 10 de dezembro de 2010.

**DEDICO**

Aos meus pais Elza e Edair,  
pelo incentivo, confiança e apoio depositados

**HOMENAGEM**

Ao meu orientador e amigo Prof. Dr Wagner Bettiol, pelo empenho, dedicação na condução e realização deste trabalho, convivência, paciência, amizade e ensinamentos.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me dado coragem para superar todas as barreiras;  
À CAPES, pela concessão da Bolsa de Estudo para a realização deste trabalho;

À Embrapa Meio Ambiente, por toda a logística oferecida para a realização e condução dos trabalhos;

A Pesquisadora da Embrapa Meio Ambiente Lilia Aparecida Salgado de Moraes, pela amizade e incentivo;

Aos funcionários do Campo Experimental da Embrapa Meio Ambiente: Brasilino, Antonio, Laércio, Vicente, Abrahão e Henrique, pelo indispensável auxílio na realização dos trabalhos:

Ao Programa de Pós-graduação em Agronomia (Proteção de Plantas).  
Aos Professores do Departamento de Proteção de Plantas, pela contribuição de cada um em minha formação profissional;

Aos meus irmãos Edair, Elaine, Eluciane e Paula, todas as horas e nas horas mais difíceis que passamos juntos, pela amizade, companheirismo e paciência;

Aos meus cunhados Vera, Luciano e Roberto e meus sobrinhos queridos que tanto amo como se fossem meus filhos Felipe, Karina, Gabriel e Pietro;

Aos amigos da Embrapa Meio Ambiente, em especial a Rodrigo, Gabriela Grangheli, Flavia, Alexandre Sereda, Élide, Eduardo Bernado, Luciana(s), Sarah, Zayame e Regiane;

A minha melhor amiga e irmã para toda a vida Elen Ribeiro dos Santos;

Aos meus amigos das Faculdades Metropolitanas Unidas Allysson, Bianca, Daniela Vidotti, Dani, Denise, Fernanda Galanti, Fernanda Pozzi, Gessé Justus, Gentilda, Juliana Marinheiro, Maria Carolina, Marina, Marco Aurélio, Nanci e Pedro Virgilio e pelo carinho amizade;

A minha amiga Débora por ter me dado tantas caronas e ter me agüentado por tanto tempo;

Aos funcionários do Laboratório de Microbiologia Ambiental da Embrapa Meio Ambiente João Luiz, Márcia, Elke e Rosely, pelo carinho, dedicação, presteza e profissionalismo com que atuam;

Aos pesquisadores da Embrapa Meio Ambiente, em especial aos Drs. Wagner Bettiol, Itamar Soares de Melo, Raquel Ghini e Célia M. M. Souza;

À seção de Pós-Graduação do Câmpus da FCA, pela presteza quando solicitada;

À todas as funcionárias da Biblioteca da Unesp FCA, em especial a Célia e Janaína.

Ao Conselho do Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Proteção de Plantas da Faculdade de Ciências Agrônômica da UNESP, pela oportunidade de realização dos trabalhos;

A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho;

**AGRADEÇO.**

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	página
RESUMO.....	13
SUMMARY.....	15
1-INTRODUÇÃO .....	17
2- REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1 Doenças de pós-colheita em citros.....	20
2.2 Principais doenças de pós-colheita em citrus.....	22
2.2.1 Bolor verde dos citros ( <i>Penicillium digitatum</i> ).....	22
2.2.2 Mancha Petra dos citros ( <i>Guignardia citricarpa</i> ).....	24
2.3 Controle biológico e alternativo de doenças em pós-colheita.....	26
2.4 Controle biológico e alternativo de citros em pós-colheita .....	31
3-MATERIAL E MÉTODOS.....	34
3.1 Extração dos óleos essenciais.....	34
3.1.2 Obtenção dos agentes de biocontrole.....	35
3.2 Isolamento e teste de patogenicidade de <i>Penicillium digitatum</i> e <i>Guignardia citricarpa</i> .....	36
3.3 Efeito de óleos essenciais na inibição da germinação de conídios de <i>Penicillium digitatum</i> .....	39
3.4 Controle de <i>Penicillium digitatum</i> em frutos de laranja com óleos fixos, óleos essenciais e agentes de biocontrole.....	40
3.5 Efeito dos produtos alternativos na inibição de <i>Penicillium digitatum in vitro</i> .....	42
3.6 Ação fungicida e fungistática dos óleos fixos e essenciais sobre <i>P.digitatum</i> .....	43
3.7 Óleos essenciais, óleos fixos e antagonistas no controle de <i>Guignardia citricarpa</i> em frutos de laranja ‘Pera’.....	43
3.8 Efeito dos produtos alternativos na inibição de <i>Guignardia citricarpa in vitro</i> .....	44
3.9 Efeito dos óleos fixos e essenciais sobre o desenvolvimento dos agentes de	



	7
biocontrole.....	45
3.10 Bioautografia.....	46
3.11 Análise Sensorial .....	47
3.13 Análise Estatística .....	50
4- RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	51
4.1 Isolamento e teste de patogenicidade de <i>Penicillium digitatum</i> e <i>Guignardia citricarpa</i> .....	51
4.2 Efeito de óleos essenciais e agentes de biocontrole na inibição da germinação de conídios de <i>Penicillim digitatum</i> .....	51
4.3 Controle de <i>Penicillium digitatum</i> em frutos de laranja com óleos fixos, óleos essenciais e agentes de biocontrole.....	56
4.4. Efeito dos produtos alternativos na inibição do crescimento micelial de <i>Penicillium digitatum in vitro</i> .....	67
4.5 Efeito de óleos essenciais e fixos e antagonistas no controle de <i>Guignardia citricarpa</i> em frutos de laranja ‘Pera’ .....	71
4.6 Efeito dos óleos fixos e essenciais sobre o desenvolvimento dos agentes de biocontrole.....	74
4.7 Determinação de compostos presentes nos óleos fixos e essenciais por Cromatografia em Camada delgada e bioautografia.....	77
4.8 Análise sensorial .....	79
4.9 Considerações finais.....	81
5- CONCLUSÃO.....	84
6- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	86

## LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Produtos comerciais para o biocontrole de patógenos de pós-colheita.....	29
2	Atributos sensoriais avaliados pelos provadores e respectivas definições.....	49
3	Inibição da germinação de conídios de <i>Penicillium digitatum</i> por agentes de biocontrole, empregando o método da epiderme destacada da cebola.....	56
4	Efeito de óleos essenciais e fixos na incidência e severidade do bolor verde causado por <i>Penicillium digitatum</i> em frutos de laranja 'Pêra' na dose de 1 mL. L <sup>-1</sup> .....	59
5	Efeito de óleos essenciais e fixos na incidência e severidade do bolor verde causado por <i>Penicillium digitatum</i> em frutos de laranja 'Pêra' na dose de 10 mL. L <sup>-1</sup> .....	60
6	Efeito de óleos essenciais e fixos na incidência e severidade do bolor verde causado por <i>Penicillium digitatum</i> em frutos de laranja 'Pêra' na dose de 100 mL. L <sup>-1</sup> .....	61
7	Efeito de óleos essenciais e fixos na incidência e severidade do bolor verde causado por <i>Penicillium digitatum</i> em frutos de laranja 'Pêra' na dose de 1000 mL. L <sup>-1</sup> .....	62
8	Efeito de óleos essenciais e fixos na incidência e severidade do bolor verde causado por <i>Penicillium digitatum</i> em frutos de laranja 'Pêra' na dose de 10.000 mL. L <sup>-1</sup> .....	63
9	Efeito de óleos essenciais e fixos na incidência e severidade do bolor verde causado por <i>Penicillium digitatum</i> em frutos de laranja 'Pêra' na dose de 100.000 mL. L <sup>-1</sup> .....	64
10	Efeito dos agentes de biocontrole na concentração de 10 <sup>8</sup> UFC/mL <sup>-1</sup> sobre a severidade do bolor verde causado por <i>Penicillium digitatum</i> em frutos de laranja 'Pêra' .....	65
11	Efeito dos agentes de biocontrole na concentração de 10 <sup>8</sup> UFC/mL <sup>-1</sup> sobre a incidência do bolor verde em frutos de laranja 'Pêra'.....	66
12	Efeito dos agentes de biocontrole na evolução do número lesões de <i>Guignardia citricarpa</i> em laranja 'Pera' orgânica em condição de pós-colheita.	73

13	Resultados dos testes de bioautografia com os óleo fixos e essências e agentes biocontrole de que apresentaram atividade antifúngica.....	78
14	Resultados da análise sensorial realizada com os degustadores.....	80

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Sistema de hidrodestilação utilizado na extração de óleos essenciais. a) Manta aquecedora, b) balão volumétrico, c) clevenger, d) condensador e e) mangueiras de aferrecimento.....	37
2	Separação da fase aquosa do óleo essencial. a) óleo essencial de <i>Citrus aurantifolia</i> e b) Fase aquosa.....	37
3	Esquema de Preparação do Experimento para avaliar o efeito de óleos fixos e essências, bem como agentes de biocontrole na inibição do crescimento de <i>Penicillium digitatum</i> .....	43
4	Placa de cromatografia em camada para avaliar os constituintes dos óleos que inibiam os fitopatógenos e os agentes de biocontrole.....	47
5	Inibição da germinação de conídios de <i>Penicilium digitatum</i> com óleos essenciais e fixos, empregando o método da epiderme destacada da cebola. Nas seguintes concentrações (A) 1 mL.L <sup>-1</sup> ; (B) 10 mL.L <sup>-1</sup> e (C) 100 mL.L <sup>-1</sup> ..	53
6	Inibição da germinação de conídios de <i>Penicilium digitatum</i> com óleos essenciais e fixos, empregando o método da epiderme destacada da cebola. Nas seguintes concentrações (D)1000 mL.L <sup>-1</sup> ; (E)10.000 mL.L <sup>-1</sup> ; (F)100.000 mL.L <sup>-1</sup> ..	54
7	Inibição do crescimento micelial de <i>Penicillium digitatum</i> por óleos essenciais e fixos. (A) citronela; (B) Gengibre; (C) Alecrim Pimenta; (D) Menta; (E) Limão; (F) Alho; (G) Maria bonita; (H) Alfavaca; (I) Manjeriçao e (J) hiabendazole.....	68
8	Inibição de Crescimento micelial de <i>Penicillium digitatum</i> por óleos fixos e essenciais, nas concentrações de (A)1 mL.L <sup>-1</sup> ; (B)10 mL.L <sup>-1</sup> e (C)100 mL.L <sup>-1</sup>	69
9	Inibição de Crescimento micelial de <i>Penicillium digitatum</i> por óleos fixos e essenciais, nas concentrações (D) 1000 mL.L <sup>-1</sup> ; (E) 10.000 mL.L <sup>-1</sup> e (F)100.000 mL.L <sup>-1</sup> .....	70
10	Antibiograma dos agentes de biocontrole frente aos óleos de (A) gengibre, (B) capim limão, (C) Maria bonita, (D) alfavaca, (E) citronela, (F) Alecrim, (G) Alho, (H) Manjeriçao, (I) Menta e (J) thiabendazole.....	74
11	Efeito de 100.000 mL.L <sup>-1</sup> dos óleos fixos e essenciais sobre o desenvolvimento	

	de <i>Bacillus subtilis</i> (Serenade®), <i>Bacillus subtilis</i> e <i>Bacillus licheniformis</i> (Nemix®), <i>Pichia guillermondii</i> (L29), <i>Sporobolomyces roseus</i> (L41) <i>Rhodotorula mucilagenosa</i> (L17) e <i>Sporidiobolus pararoseus</i> .....	75
12	Efeito dos óleos fixos e essenciais sobre o desenvolvimento de <i>Debaryomyces hansenii</i> (L62), <i>Pichia membranifaciens</i> (L21), bactéria isolada de laranja, <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>Pichia</i> sp (L4-1).....	76

## LISTA DE ANEXOS

Anexos		Página
01	Composição química de <i>Ocimum basilicum</i> var. Maria bonita.....	97
02	Composição química do óleo essencial de Gengibre ( <i>Zingiber officinalis</i> ).....	98
03	Composição química do óleo essencial de Manjeriço ( <i>Ocimum basilicum</i> )....	98
04	Composição química do óleo essencial de Citronela ( <i>Cymbopogon citratus</i> )....	99
05	Composição química do óleo essencial de Alecrim Pimenta ( <i>Lippia sidoides</i> )	100
06	Composição química do óleo essencial de <i>Ocimum gratissimum</i> (Alfavaca Cravo).....	101
07	Composição química do óleo essencial de <i>Pogostemon cablin</i> (Patchouli).....	102
08	Composição química do óleo essencial de Capim Limão ( <i>Cymbopogon citratus</i> ).....	103
09	Composição química do óleo essencial de limão Tahiti ( <i>C. latifolia</i> Tanaka).	104

**CONTROLE DE *GUIGNARDIA CITRICARPA* E *PENICILLIUM DIGITATUM* EM PÓS-COLHEITA DE FRUTOS DE LARANJA COM ÓLEOS ESSENCIAIS E AGENTES DE BIOCONTROLE.** Botucatu, 2010. xp. Tese (Doutorado em Agronomia/Proteção de Plantas) –Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.

**Autor: LILIANA PATRICIA VITAL DE MATTOS**

**Orientador: WAGNER BETTIOL**

## **RESUMO**

*Penicillium digitatum*, agente causador do bolor verde, e *Guignardia citricarpa*, agente causador da mancha preta, depreciam os frutos cítricos. O controle desses patógenos em frutos é realizado com fungicidas sintéticos. Devido a preocupação da sociedade com os riscos de contaminação ambiental, intoxicação humana principalmente infantil e animal e ao surgimento de isolados fúngicos resistentes aos fungicidas sintéticos, estão em desenvolvimento técnicas alternativas aos fungicidas para uma agricultura mais sustentável. O objetivo do trabalho foi avaliar os efeitos de óleos essenciais e fixos e dos agentes de biocontrole no controle de *P. digitatum* e *G. citricarpa* em frutos laranja Pêra em pós-colheita. Assim, foram testados os óleos fixos de *Allium sativum*, *Copaifera langsdorffii*, *Azadirachta indica*; e os óleos essenciais de *Pogostemon cablin*, *Mentha arvensis*, *Eucalyptus* spp., *Cymbopogon citratus*, *Ocimum basilicum* var. Maria bonita, *Romarinus officinalis*, *Lippia sidoides*, *Zingiber officinale*, *Citrus aurantifolia*, *Piper aduncum* e *Ocimum basilicum*. Além dos óleos, também foram estudados os seguintes agentes de biocontrole: *Bacillus subtilis* (Serenade®), *Bacillus subtilis* e *Bacillus lichiniformes* (Nemix®), *Pichia guilliermondii* (L29), *Sporobolomyces roseus* (L41), *Rhodotorula mucilagenosa* (L17), *Sporodiobolus pararoseus*, *Pichia* sp. (L4-1), *Debaryomyces hansenii* (L62), *Pichia membranifaciens* (L21) e uma bactéria isolada da laranja. Tanto os agentes de biocontrole, quanto os óleos foram testados *in vivo* e *in vitro* contra os dois patógenos. Para a avaliação da atividade dos óleos essenciais e dos antagonistas *in vivo*, no controle de *P. digitatum*, foram utilizadas laranjas Pêra. Cada fruto foi ferido em dois pontos opostos, na região equatorial, atingindo a região do albedo. Após o ferimento, os frutos foram inoculados com 20 µL da suspensão de conídios de *P. digitatum* (10<sup>5</sup> conídios/mL), seguindo-se da imersão em uma suspensão de células de cada agente de biocontrole nas seguintes concentrações de 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup>, 10<sup>7</sup>, 10<sup>8</sup> UFC/ mL. A mesma metodologia foi aplicada para os

tratamentos com óleos fixos e essenciais utilizando-se as concentrações de 1 mL.L<sup>-1</sup>; 10 mL.L<sup>-1</sup>; 100 mL.L<sup>-1</sup>; 1000 mL.L<sup>-1</sup>; 10.000 mL.L<sup>-1</sup> e 100.000 mL.L<sup>-1</sup>. Os produtos foram aplicados preventivamente (24 h antes da inoculação do patógeno), simultâneo à inoculação do patógeno e de forma curativa (24 h após a inoculação do patógeno). Os frutos foram incubados a 25 °C, em ambiente com 85 % UR. A avaliação foi realizada seis dias após a instalação do experimento. Para os estudos com *G. citricarpa in vivo*, foram utilizados frutos de laranjas Pêra naturalmente infectados que tiveram suas manchas destacadas por uma caneta de retro projetor. A aplicação e as concentrações dos produtos foram semelhantes as anteriores. Após secos, os frutos foram acondicionados em câmara, com temperatura e umidade controladas (25° C, UR 75-85%). A avaliação da severidade foi feita pela contagem das manchas pretas que surgiram após o acondicionamento. *In vitro* foi avaliado o potencial desses produtos alternativos em inibir a germinação de esporos e o crescimento micelial de *P. digitatum* nas mesmas concentrações citadas acima. Em todos os estudos foi utilizado o fungicida Thiabendazole Tecto® como padrão e uma testemunha absoluta (água). Para *P. digitatum*, os óleos essenciais e fixos, nas concentrações 10.000 e 100.000 mL.L<sup>-1</sup>, e os agentes de biocontrole acima de 10<sup>5</sup> conídios/mL controlaram o bolor verde nos frutos, e inibiram a germinação e o crescimento micelial. Não foram verificadas diferenças significativas entre as aplicações dos óleos (24 h antes, simultânea e 24 h depois da aplicação do patógeno). Para *G. citricarpa* não foi verificado efeito desses produtos. Os óleos nas maiores concentrações causaram fitotoxidade e alteraram o sabor dos frutos. Assim, conclui-se que os agentes de biocontrole apresentam potencial de uso e devem ser testado em condições comerciais.

---

**Palavras chave:** Mancha preta dos frutos cítricos, bolor verde, controle biológico, pós-colheita.



**CONTROL OF *Guignardia citricarpa* AND *Penicillium digitatum* IN ORANGE FRUITS POST-HARVEST WITH ESSENTIAL OILS AND BIOCONTROL AGENTS. Botucatu, 2010. xp. Thesis (Ph.D. in Agronomy/Plant Protection) - Faculty of Agricultural Sciences, Universidade Estadual Paulista.**

**Author: LILIANA PATRICIA VITAL DE MATTOS**

**Advisor: WAGNER BETTIOL**

## **ABSTRACT**

*Penicillium digitatum*, causal agent of green mold, and *Guignardia citricarpa* causal agent of black spot. Detracts the citrus fruit, the control of these pathogens is made with synthetic fungicides. Due to concern about the risks of environmental contamination, human, mainly children and animal toxicity and the emergence of fungal isolates resistant to fungicides, various researches has been development to obtain alternative techniques for a fungicides. The objectives of this work was to evaluate the effeties fix and essencial oils and biocontrol agents for the control of *P. digitatum* and *G. citricarpa* on Pera orange fruits in postharvest. Thus, were tested the fixed oils from *Allium sativum*, *Copaifera langsdorffii*, *Eucalyptus* spp. *Azadirachta indica*, and the essential oils of *Pogostemon cablin*, *Mentha arvensis*, *Cymbopogon citratus*, *Ocimum basilicum* var. Maria bonita, *Romarinus officinalis*, *Lippia sidoides*, *Zingiber officinale*, *Citrus aurantifolia*, *Piper aduncum* and *Ocimum basilicum*. In addition were also studied the following biocontrol agents: *Bacillus subtilis* (Serenade ®), *Bacillus subtilis* and *Bacillus lichiniformes* (Nemix ®), *Pichia guilliermondii* (L29), *Sporobolomyces roseus* (L41), *Rhodotorula mucilagenosa* (L17), *Sporodiobolus pararoseus*, *Pichia* spp. (L4-1), *Derbaryomyces hansenii* (L62), *Pichia membranifaciens* (L21) and a bacterium isolate of the orange. Both biocontrol agents as the oils, were tested *in vivo* and *in vitro* against both pathogens. For the assessment of activity of essential oils and antagonists *in vivo* in controlling *P. digitatum* were used Pera orange. Each fruit was wounded in two opposite points in the equatorial region, reaching the albedo. After the injury, the fruits were inoculated with 20 mL of conidial suspension of *P. digitatum* ( $10^5$  conidia / mL), followed by immersion in a suspension of cells of each biocontrol agent in the concentration:  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$  UFC/ mL. The same methodology was applied for essential and fixed oils, using concentrations of  $1 \text{ mL.L}^{-1}$ ; 10

mL.L<sup>-1</sup>; 100 mL.L<sup>-1</sup>; 1000 mL.L<sup>-1</sup>; 10,000 mL.L<sup>-1</sup> and 100,000 mL.L<sup>-1</sup>. The alternative products were applied preventively (24 h before pathogen inoculation), simultaneous to the inoculation of the pathogen and of the curative variety (24 h after pathogen inoculation). The fruits were incubated at 25 ° C in an environment with 85% RH. The evaluation was performed six days after the inoculation. In the studies with *G. citricarpa in vivo* was used Pera orange fruits naturally infected, which had their spots highlighted by a retro projector pen. The application of products was made by dipping the fruit in suspensions of bioagents and oils. After dried, the fruits were placed in a chamber with controlled temperature and humidity (25°C, RH 75-85%). The assessment of severity was performed by counting the black spots that appear after conditioning. *In vitro* it was evaluated the potential of these alternative products to inhibit the germination of spores and micelial growth of *P. digitatum*. the same concentrations described above. In all these studies was used fungicide Thiabendazole Tecto® as standard and control (water). For *P. digitatum*, the essential and fixed oils, in concentrations 10.000 and 100.000 mL.L<sup>-1</sup>, and biocontrol agents above 10<sup>5</sup> conidia controlled green mold and inibity esporos germinatn and micelial growths similar to the fungicide There were no significant differences between the applications of oil (24 h before, simultaneously and 24 h after the inoculation of the pathogen). For *G. citricarpa* no effect was found for these products. Oils caused phytotoxicity when used in 10.000ppm and change flavours the fruits. Then, the biocontrol agnts has potential for biological control in citrus postharvest a suggest study in commercial conditions.

---

Keywords: black spot of citrus, green mold biological control, postharvest.

## 1. INTRODUÇÃO

A citricultura brasileira ocupa uma área de, aproximadamente, 800.000 ha, sendo que o Estado de São Paulo possui cerca de 565.000 ha distribuídos em 330 municípios e em 29.000 propriedades (AGRIANUAL, 2009). A maior parte da produção é destinada à exportação de suco industrializado, gerando receita anual superior a dois bilhões de dólares. O suco é exportado principalmente para Estados Unidos, Japão e China. A exportação brasileira de suco de laranja chegou a um milhão de toneladas, refletindo em aumento de 6,8% em relação ao ano de 2007 (ASSOCITRUS, 2009).

As doenças representam um grande problema para a citricultura brasileira e são responsáveis por importantes perdas. As perdas econômicas ocasionadas por doenças de pós-colheita representam um dos principais problemas da citricultura brasileira e mundial. Vários fatores relacionados com o fruto, os patógenos, as condições climatológicas e as condições em pós-colheita determinam a incidência e a severidade destas doenças (PALOU et al., 2001; FISCHER et al., 2008). Os frutos de citros são atacados por vários patógenos, dentre eles, fungos (*Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Ceratocystis*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Guignardia*, *Lasiodiplodia*, *Monilinia*, *Mucor*, *Penicillium*, *Pestalotiopsis*, *Phoma*, *Phomopsis*, *Phytophthora* e *Rhizopus*), bactérias (*Erwinia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Acetobacter* e *Enterobacter*), leveduras (*Candida* e *Saccharomyces*) e vírus (*Citrus tristesa virus*, *Citrus leprose vírus*, *Citrus psorosis vírus*)

Entre as doenças mais importantes em pós-colheita, destacam-se os bolores causados por *Penicillium* spp. (FRANCO; BETTIOL, 2002; TOFFANO, 2005). *Penicillium digitatum* e *Penicillium italicum* causam o bolor verde e azul, respectivamente. A pinta preta, causada por *Guignardia citricarpa*, que ocorre ainda no campo, também é uma importante doença de pós-colheita, pois os sintomas podem surgir na fase de pós-colheita e, caso seja detectado um único fruto com sintoma dessa doença, todo o lote é rechaçado no mercado internacional.

O controle destes patógenos em frutos, principalmente os destinados à exportação, é realizado com fungicidas sintéticos do grupo dos benzimidazóis (carbendazim e tiofanato metílico), estrobilurinas (pyraclostrobin, azoxystrobin e trifloxystrobin), ditiocarbamatos (mancozeb e propineb) e também produtos à base de cobre (oxicloreto de cobre, hidróxido de cobre, óxido cuproso e sulfato de cobre na forma de calda bordalesa). Esses produtos são utilizados com sucesso no controle dessas doenças (QUING; SHIPING, 2000; NUNES et al., 2002; JONES; PRUSKY, 2002). No caso de pinta preta o controle é efetivo se for realizado nas condições antes da colheita.

Devido à preocupação com os riscos de intoxicação humana, surgimento de isolados fúngicos resistentes aos fungicidas e à proibição da utilização de fungicidas em pós-colheita em alguns mercados, maiores restrições ao uso de produtos sintéticos estão sendo impostas e não há substitutos viáveis até o momento. Nesse sentido, Torres et al. (2008) discutem as possíveis alternativas ao uso de fungicidas para o controle do bolor verde e azul dos frutos cítricos.

Com base no exposto e devido ao sucesso obtido por Torres et al. (2008); Franco e Bettiol (2002) e Toffano (2005), esse trabalho teve por objetivos avaliar os efeitos de agentes de biocontrole e de óleos essenciais no controle de *Penicillium digitatum* e *Guignardia citricarpa* em pós-colheita de laranja 'Pera', visando obter uma alternativa aos fungicidas sintéticos, bem como, analisar os mecanismos de ação envolvidos no controle.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

A demanda mundial por frutas e hortaliças está crescendo continuamente nos últimos anos, em virtude, principalmente, da conscientização da população acerca da importância de uma alimentação saudável e do reconhecimento de sua participação na prevenção de várias enfermidades. Entre as frutas mais exportadas estão citros, manga, maçã, mamão e melão, isto indica uma crescente apreciação pelo consumo *in natura* ou sucos de frutas tropicais e subtropicais. Apesar da exportação de frutas US\$11 bilhões, o Brasil ainda está longe de seu verdadeiro potencial (COELHO et al., 2003).

De modo geral, as perdas em pós-colheita são de difícil controle e são responsáveis por grandes porcentagens de perdas de produtos colhidos (MORANDI, 2002). De acordo com Benato (2002), as perdas em pós-colheita em frutos tropicais e subtropicais, na maioria dos países em desenvolvimento, oscilam entre 20 e 80%. Segundo Chitarra e Chitarra (1998), a aparência é o atributo de qualidade mais importante, pois determina o valor de comercialização das frutas e hortaliças. Em produtos olerícolas, a qualidade é determinada pelas características físicas, como cor, tamanho, forma, defeitos e deteriorações.

As perdas de frutas e hortaliças em pós-colheita são influenciadas por diversos fatores, entre os quais o manejo inadequado dos produtos, condições desfavoráveis de colheita, armazenamento e comercialização, além das modificações físicas e bioquímicas do processo de senescência e atividade microbiana. Essas podridões são de difícil controle e são apontadas como responsáveis por grande porcentagem de perdas de produtos colhidos (KRETZSCHMAR, 1991; FISCHER et al., 2008; NICOLI; ZAMBOLIM et al., 2009).

Geralmente as frutas são ricas em vitaminas, proteínas, sais minerais, carboidratos e fibras. Além de serem, geralmente, tenras e suculentas. Dessa forma, constituem substratos ricos e adequados ao desenvolvimento microbiano. Assim, diversos micro-organismos estão associados às podridões em pós-colheita, destacando-se os fungos que penetram por ferimentos acidentais durante a colheita, transporte e armazenamento ou outras aberturas naturais como lenticelas e partes florais (CREEMMES, 1989; KRETZSCHMAR, 1991; OLIVEIRA et al., 2006).

A incidência de doenças fúngicas, segundo Silveira et al. (2005), representam 82,53 % em mamão (*Carica papaya*), 21,9% em laranja (*Citrus sinensis*), 38,5% em abacate (*Persea americana*), 17,5% em limão (*Citrus limonum*) e 15,5% em maracujá (*Passiflora edulis flavicarpa.*), das doenças em pós-colheita. Os patógenos que apresentaram maiores frequências são *Colletotrichum gloeosporioides* em mamão (44,9%) e abacate (16,0%), *Lasiodiplodia theobromae* (11,9%) em laranja, *Phaceloma perseae* (20,0%) em abacate, *Sphaceloma fawcetti* Jenkins (6,2%) em limão e *Cladosporium herbarum* (10,3%) em maracujá.

Segundo Ritzinger (2000), o controle de doenças pós-colheita deve ser iniciado ainda no campo, na fase de desenvolvimento dos frutos, para evitar a sua contaminação e posterior aparecimento de podridões. Vários métodos de controle se aplicam, de forma única ou integrada, para atingir doenças de frutas pós-colheita, as quais, geralmente, são afetadas por mais de um patógeno. Um bom exemplo é uso de substâncias menos tóxicas como os potabilizadores de água, alguns fertilizantes, cera comestível, derivados de celulose e quitosana. Essas substâncias podem ser utilizadas para a preservação fisiológica dos frutos e também para a redução da incidência de patógenos causadores de podridões em pós-colheita (BENATO et al., 2001; NISPEROS; BALDWIN, 1996).

## **2.1 Doenças de pós-colheita em citros**

Cultivado em mais de cem países dos cinco continentes, com uma produção superior a 100 milhões de toneladas, os citros ocupam a primeira posição entre as frutíferas cultivadas. O fato de ser cultivado tanto em países do hemisfério norte quanto do sul, os quais apresentam diferentes épocas de produção, assegura oferta contínua de frutos de citros

durante o ano. Os frutos cítricos, em sua maioria, são colhidos manualmente e transportados para empacotadora, onde são lavados em água contendo uma mistura de fungicida e sanitizante para proteger contra infecções antes do empacotamento (OLIVEIRA et al., 2006).

As causas das perdas pós-colheita podem ser: fisiológicas (inevitáveis e decorrentes de fatores endógenos); mecânicas (ferimentos e danos) e microbiológicas. De acordo com Oliveira et al. (2006) e Pallon et al. (2001), as principais doenças responsáveis por problemas na pós-colheita de citros relatadas no mundo, podem ser divididas em dois grupos, dependendo do período de infecção: 1- Infecções que iniciam-se na pré-colheita e continuam causando perdas na pós-colheita (*Alternaria citri*; *Botrytis cinerea*; *Colletotrichum gloeosporioides*; *Diploidea natalensis*; *Guignardia citricarpa* e *Phomopsis citri*); 2- Infecções que iniciam na pós-colheita (*Geotrichum candidum*; *Penicillium digitatum*; *Penicillium italicum* e *Rhizopus* sp.).

A probabilidade de infecção depende da quantidade de inóculo presente em um ponto do fruto suscetível. Esta relação foi relatada para *P. digitatum* (WILD; ECKERT, 1982), *Geotrichum candidum* (BAUDOIN; ECKERT, 1982) e *C. gloeosporioides* (BROWN, 1975), segundo a qual, a quantidade de esporos presentes nos galpão de embalagens de citros influi decisivamente nos níveis de podridão, especialmente nas provocadas por patógenos que penetram por ferimento, como os bolores (ECKERT; EAKS, 1989).

Os problemas derivados de alto potencial de inóculo fungico nas centrais de abastecimento têm aumentado quando existem cepas de patógenos resistentes aos fungicidas sintéticos. Este efeito foi comprovado em relação a *P. digitatum* e *P. italicum* frente aos fungicidas do grupo dos bendimidazois, ortofenilfenato sódico e imazalil, sendo que tem ocorrido tanto resistência simples, como cruzada e múltipla (PALOU et al., 2001; BROWN, 1975; ECKERT, 1990; BUS et al., 1991). Estudar a população fúngica de uma região citrícola é fundamental para se determinar a ocorrência de fitopatógenos e sua distribuição, buscando estabelecer riscos potenciais de danos às frutas e planejar adequadamente os métodos de controle (FISCHER et al., 2008).

O grau de maturação da fruta na colheita também é importante, pois condiciona a qualidade pós-colheita. Frutas cítricas colhidas muito maduras apresentam pouca firmeza e maior suscetibilidade a danos mecânicos, podridões, alterações fisiológicas e possuem uma menor vida de prateleira (PEREIRA et al., 2006). Estudos com frutíferas têm relacionado o grau de maturação a períodos de maior ou menor suscetibilidade às podridões. No entanto, não

se sabe ao certo, o papel das características físico-químicas dos frutos cítricos condicionando maior ou menor suscetibilidade às podridões (SHARMA; KAUL, 1988; MARI et al., 2003; NORTHOVER; BIGGS, 1990).

## 2.2 Principais doenças de pós-colheita em citros

As podridões estão entre as principais doenças em de pós-colheita em citros e se expressam desde a colheita até seu uso pelo consumidor. A porcentagem de frutos varia de 3 a 6%. Entretanto, sob condições favoráveis aos fitopatógenos perdas consideráveis em pós-colheita podem ocorrer, atingindo 50% no período de comercialização de laranja (FISCHER; LOURENÇO; AMORIM, 2008).

### 2.2.1 Bolor verde dos citros (*Penicillium digitatum*)

*Penicillium digitatum* Sacc. agente causal do bolor verde, apresenta tamanho dos conídios variando de 4 a 7  $\mu\text{m}$  x 6 a 8  $\mu\text{m}$ , com formato ligeiramente cilíndrico a ovalado. Estes são produzidos em cadeia, motivo pelo qual são denominados esporos catenulados, variando ligeiramente na forma e no tamanho, mesmo sendo originários do mesmo cordão de esporos. Assim como as outras espécies de *Penicillium* que atacam os citros, *P. digitatum* produz enzimas capazes de dissolver a lamela média dos tecidos infectados dos frutos, provocando podridão mole. A fase perfeita desses fungos é rara na natureza. Sobrevivem saprofiticamente em pomares, outros ambientes e sobre vários tipos de substratos orgânicos, na forma de conídios. As infecções originam-se de conídios carregados pelo vento que atingem a superfície dos frutos, onde penetram por ferimentos (LARANJEIRA et al., 2002; FISCHER et al., 2008). Normalmente é a principal doença pós-colheita dos citros e está disseminada em todos os países produtores, afetando todas as espécies e cultivares cítricas. No entanto, a preocupação é maior com as variedades consumidas *in natura*, como as laranjas de umbigo “Bahia”, laranja “Pera” e laranja Lima. Sua ocorrência depende muito das condições climáticas e da forma de



manipulação dos frutos, desde o pomar até a chegada ao consumidor, podendo ocorrer tanto no armazenamento como no transporte do produto.

O bolor verde é uma podridão mole dos frutos com posterior cobertura da lesão pelo micélio branco e por grande número de esporos verdes do fungo, que chegam a tomar todo o fruto. Além disso, possui dois estádios sintomatológicos o primeiro apresenta uma área com aproximadamente meio centímetro e cede facilmente à pressão dos dedos. O segundo estágio compreende o aparecimento de micélio branco na superfície do fruto e o desenvolvimento, no centro do micélio, de uma massa de esporos verdes. Em condições ideais de temperatura e umidades, em menos de dois dias, a lesão alcança tamanho entre 4 e 5 cm de diâmetro, atingindo as vesículas de suco (LARANJEIRA et al., 2002; TOFFANO, 2005).

Os esporos maduros soltam-se com grande facilidade a qualquer movimento ou impacto sobre os frutos afetados. Assim, são facilmente dispersos pelo manuseio, pela agitação ou exposição dos frutos a corrente de ar. Em condições de baixa umidade, os frutos murcham e mumificam. Sob condições de alta umidade, outros fungos e bactérias desenvolvem-se na lesão e o fruto apodrece mais rapidamente. No armazenamento a granel, frutos sadios podem ser depreciados por ficarem manchados com os esporos liberados pelos frutos doentes. Frutos infectados têm seu período de armazenamento reduzido pela formação de etileno, que acelera o processo de maturação, diminuindo a vida de prateleira (FRANCO; BETTIOL, 2002; FEICHTENBERGER et al., 2005).

A infecção é dependente de ferimentos e pode ocorrer em pomares, afetando frutos em fase final de maturação. Contudo, eles causam maiores prejuízos quando ocorrem após a colheita, durante as operações de processamento, armazenamento e transporte. Além dos ferimentos, a temperatura é o outro fator importante para o desenvolvimento do bolor verde. Temperaturas em torno de 24 °C são consideradas ótimas e maiores que 30 °C ou menores que 5-7 °C paralisam o crescimento do fungo. Em geral, à medida que ocorre diminuição da temperatura, o desenvolvimento do fungo é mais lento e, portanto, os sintomas são menos evidentes. Em *packing-houses*, devido à presença constante de frutos sadios e doentes, os ciclos de infecção e esporulação podem ocorrer repetidas vezes no período de colheita. Em contêineres, a infecção não ocorre de um fruto doente para um sadio, já que não há transmissão por contato consumo (LARANJEIRA et al., 2002).

O bolor verde causado por *Penicillium digitatum* é a principal doença que ocorre em pós-colheita nos frutos cítricos (FRANCO; BETTIOL, 2002;

FEICHTENBERGER et al., 2005). A sua ocorrência está relacionada com as condições climáticas e com o manejo dos frutos desde a pré-colheita até o consumo (LARANJEIRA et al., 2002). A doença está presente em todas as partes do mundo onde ocorre a produção de citros e causa perdas consideráveis. As perdas são maiores nas localidades onde as condições de transporte e armazenamento não são adequadas, como por exemplo, no Brasil.

### **2.2.2 Mancha Preta dos citros (*Guignardia citricarpa*)**

A pinta preta, causada por *Guignardia citricarpa* (fase anamórfica de *Phyllosticta citricarpa*), é responsável por elevados prejuízos na cultura dos citros, atingindo as variedades mais importantes, depreciando os frutos comercialmente, reduzindo a produtividade devido à queda precoce de frutas e provocando alterações nos padrões tecnológicos (GOES 1998; 2002; REIS et al., 2006). A sua importância é maior na pré-colheita para frutas destinadas à produção de suco. Entretanto, é limitante para exportação de frutas *in natura*, pois a tolerância é zero.

Uma característica da mancha preta é que o fungo pode estar presente em uma área por muitos anos, antes dos sintomas aparecerem. Às vezes, pode levar de 5 a 30 anos para os primeiros sintomas serem percebidos e a doença atingir proporções epidêmicas (KOTZÉ, 1981; 1996). Os sintomas observados nas folhas são lesões caracterizadas pela formação de um centro acinzentado com bordos salientes marrom-escuros e um halo amarelo ao redor, parecido com os sintomas encontrados nos frutos. As lesões em folhas são frequentemente encontradas em tangerinas e limoeiros verdadeiros (FUNDECITRUS, 2000). Os primeiros sintomas nos frutos aparecem no início da maturação, o que é muito tarde para qualquer tentativa de controle (GÓES et al., 1990). Um longo período de latência (dormência ou quiescência), de seis a oito meses a depender da variedade, caracteriza essa doença (GÓES, 1998; WHITESIDE; GARNSEY; TIMMER, 1993).

A mancha preta dos citros pode iniciar-se de ascósporos e de picnidiósporos, sendo que nas epidemias a importância dos ascósporos é maior. Os picnidiósporos podem ocorrer em lesões de frutos, em ramos finos e secos, e em folhas caídas no

solo. Ocasionalmente, também nos pedúnculos e em folhas presas na árvore. Porém, a maior parte dos picnidiósporos é produzida sobre folhas de citros caídas no chão do pomar e, se presente, em frutos maduros infectados. Os picnidiósporos não apresentam um mecanismo especial de liberação para a atmosfera e aqueles presentes em folhas mortas sobre o chão podem atingir frutas suscetíveis apenas por respingos de gotas de chuva. Picnidiósporos se constituem em uma fonte de inóculo quando frutas temporãs ou frutos caídos tardiamente, com lesões, permanecem nas árvores depois do florescimento ou da formação dos primeiros frutos (KOTZÉ, 1981, 1996). A mancha preta pode ser causada por duas fontes de inóculo, ou seja, duas vias de infecção: pelos picnidiósporos ou pelos ascósporos (KOTZÉ, 1989). Os primeiros são produzidos em picnídios que se formam em lesões de folhas e frutos e emergem através de um ostíolo. São envolvidos em uma substância mucilaginosa que tem a função de protegê-los contra condições climáticas adversas. A água, ao passar pela superfície destas estruturas solubiliza esta mucilagem carregando a suspensão até a superfície de órgãos suscetíveis, onde novas infecções podem ser iniciadas (BALDASSARI et al., 2004). Dessa forma, os picnidiósporos são disseminados somente a curtas distâncias pela ação da água, constituindo-se assim uma importante fonte adicional de inóculo (FEICHTENBERGER et al., 2005). Já os ascósporos são produzidos apenas nas folhas caídas e em decomposição, de 40 a 180 dias depois da queda das folhas ao solo. A produção é favorecida pela alternância entre os períodos de molhamento e seca das folhas, condição bastante frequente durante a estação chuvosa do ano, constituindo na principal fonte de inóculo. Podem ser carregados pelo vento, disseminando o fungo a longas distâncias, bem como serem levados por respingos de água das folhas caídas até às superfícies dos órgãos da parte baixa da copa da planta (FEICHTENBERGER et al., 1997).

Ambos os tipos de esporos germinam na superfície de órgãos suscetíveis e produzem estruturas de fixação denominadas apressórios. Uma delgada hifa de infecção é formada a partir do apressório, dando origem a uma pequena massa de micélio entre a cutícula e a epiderme. Nesta forma, o micélio pode permanecer dormente por doze meses; este período pode ser interrompido quando o fruto atingir o seu tamanho final e iniciar a maturação ou quando a folha, já caída, começar a se decompor (FEICHTENBERGER et al., 2005). O patógeno, então, coloniza os tecidos mais internos, produzindo os sintomas (McONIE, 1967).

O período crítico de suscetibilidade dos frutos para mancha preta ocorre desde a fase chumbinho até cerca de seis meses após a queda das pétalas. Esse período corresponde no Estado de São Paulo, ao período entre setembro e março, dependendo das

variedades e condições climáticas predominantes (GÓES, 1998). A manifestação da mancha preta é favorecida por vários fatores, dos quais o mais importante é a exposição dos órgãos infectados a intensa radiação solar e temperaturas elevadas. Plantas velhas e estressadas por várias causas são também mais sujeitas à doença do que plantas saudáveis e vigorosas (FEICHTENBERGER et al., 2005).

### **2.3 Controle biológico e alternativo de doenças em pós-colheita**

As perdas de frutos em pós-colheita são influenciadas por diversos fatores entre os quais se destacam: manejo inadequado dos produtos; condições desfavoráveis de colheita, armazenamento, comercialização; modificações físicas e bioquímicas, e processos naturais de senescência e afinidade microbiana pelos tecidos dos frutos. As podridões são resultantes da atividade de patógenos que provocam perdas em produtos agrícolas quando esses são cultivados em locais distantes da área de consumo. Durante a pós-colheita, os produtos que não são manipulados adequadamente e ou tratados com inibidores microbianos eficientes, podem perder a qualidade (DHINGRA, 1985; MARI; GUIZZARDI, 1998).

As perdas em pós-colheita de frutas representam um constante desafio, considerando que as frutas são órgãos que apresentam alto teor de água e nutrientes até a senescência, mantendo vários processos biológicos em atividade, apresentando desta forma maior predisposição aos distúrbios fisiológicos, danos mecânicos e ocorrência de podridões (KADER, 2002). Além disso, essas perdas representam um elevado custo haja vista que todos os riscos de produção no campo foram vencidos. Na expectativa de reduzir as podridões pós-colheita, algumas tecnologias padrões e alternativas são adotadas tais como: controle químico (inibidores de amadurecimento, fungicidas sistêmicos e protetores), controle biológico, controle físico (refrigeração, tratamento térmico, radiação, atmosfera controlada e modificada) e indução de resistência (elicitores bióticos e abióticos). Sendo que a eficácia dessas medidas pode variar conforme a espécie ou cultivar, a maturação fisiológica e as características bioquímicas do tecido da fruta (BARKAI-GOLAN, 2001). Também o conhecimento da relação patógeno x hospedeiro é importante para o adequado manejo visando ao controle de doenças em pós-colheita.

Segundo Droby et al. (2009) e Wilson e Wisniewski (1989), a principal justificativa para o desenvolvimento do controle biológico em pós-colheita foi para reduzir ou eliminar o uso de fungicidas sintéticos por causa do seu potencial em impactar a saúde humana, especialmente as crianças e o ambiente.

Wilson e Pusey (1991) estabeleceram as bases para o controle biológico de doenças em pós-colheita. Nesse trabalho apresentaram o potencial de *Bacillus subtilis* para o biocontrole de *Monilinia fructicola* em pêssego. Essa publicação foi importante e tornou-se referência para os pesquisadores na área por mais de 20 anos. Nos primeiros anos após essa publicação apenas um a dois artigos de controle biológico de pós-colheita foram publicados por ano. Entretanto, atualmente, no mínimo, uma centena deles são publicados anualmente demonstrando a importância do tema (DROBY et al., 2009).

Segundo Kretschmar (1991) e Bettiol e Ghini (1995), o biocontrole de patógenos de pós-colheita pode ser iniciado no campo (visando ao controle de patógenos que penetram em determinada época, como na floração e se mantém em dormência nos frutos) ou realizado após a colheita durante a fase de armazenamento e comercialização, pela introdução de antagonistas. Segundo Wilson & Pusey (1985) o controle biológico em pós-colheita é economicamente viável devido ao controle das condições ambientes de armazenamento, limitação e facilidade de atingir totalmente o alvo, portanto aplicação na totalidade da área de aplicação, e pelo valor do produto, haja vista se tratar de um commodity.

Os principais mecanismos de antagonismo para um agente de biocontrole em pós-colheita são: antibiose, parasitismo, indução de resistência, predação e competição por espaço e nutrientes (BETTIOL; GHINI, 1995; JANISIEWICZ; KORSTEN, 2002). Contudo, a utilização de antagonistas que não produzem antibióticos como parte do seu modo de ação tem maior aceitação no mercado, uma vez que não será introduzido antibiótico exótico na cadeia alimentar (WILSON; CHALUTZ, 1989). Nesse sentido, as leveduras são os mais estudados recentemente (DROBY et al., 2009). O potencial das leveduras para o controle de patógenos em pós-colheita tem estado em evidência nos últimos anos, por ser considerada uma alternativa segura ao uso dos fungicidas (MACHADO; BETTIOL, 2010). De acordo com Fialho (2004) e Zanardo et al. (2009), os principais mecanismos de ação das leveduras sobre os patógenos competição nutrientes e indução de resistência e interagem diretamente com as hifas fúngicas e produzindo enzimas líticas da parede celular. Diversas leveduras (*Aureobasidium pullulans*, *Cryptococcus albidus*, *Pantoea agglomerans* e *Metschnikowia fructicola*) são

registradas, em muitos países, como agentes de biocontrole de fitopatógenos tais como: *Penicillium*, *Rhizopus*, *Monilia*, *Sclerotinia* e *Erwinia amylovora* (BETTIOL et al., 2009; DROBY et al., 2009),

Uma das maiores dificuldades na utilização de antagonistas para o controle no campo tem sido a impossibilidade de controle das condições ambientes, que poderão ser letais aos antagonistas produzidos em laboratório (WILSON; PUSEY, 1985; MOURA, 2007).

Para um antagonista ser considerado ideal para atuar no ferimento fresco de frutos precisa apresentar rápida capacidade de colonização e desenvolvimento. Além disso, deve apresentar atividade metabólica nas temperaturas de armazenamento do fruto (JANISIEWICZ; KORSTEN, 2002). O avanço nos estudos de controle biológico em pós-colheita tem estimulado o desenvolvimento de produtos biológicos para o controle de podridões pós-colheita de frutos e vegetais. Oliveira (2006), Bettiol et al. (2009) e Droby (2002; 2009) apresentam diversos produtos comerciais utilizados no controle biológico de doenças em pós-colheita (Tabela 1).

As características ideais para um agente de controle biológico de doenças de pós-colheita comercial, segundo Droby et al. (2009) são: estabilidade genética, efetividade em baixas concentrações, não ser exigente em nutrientes para a multiplicação, ter capacidade de sobreviver em condições adversas, ser efetivo contra uma grande gama de patógenos de diferentes frutos, facilidade de formulação, longa vida de prateleira, fácil aplicação, resistência a agrotóxicos comumente utilizados, não causar problemas de saúde ao homem, compatibilidade com outros manejos comerciais e outros.

Um dos problemas apresentados por Torres et al. (2008) na utilização de controle biológico em pós-colheita é a reduzida capacidade de controlar infecções incipientes e quiescentes, e também a não obtenção de controle semelhante aos obtidos com fungicidas sintéticos. Para vencer esses problemas há necessidade de buscar novos antagonistas, preparar adequadas formulações, desenvolver adequados métodos de introdução do bioagente no sistema e um correto manejo em pós-colheita.

**Tabela 1:** Produtos comerciais para o biocontrole de patógenos de pós-colheita (OLIVEIRA, 2006; BETTIOL et al., 2009; DROBY, 2002; DROBY et al., 2009).

<b>Antagonista</b>	<b>Cultura</b>	<b>Patógeno</b>	<b>Produto e Formulação</b>	<b>Empresa</b>
<i>Bacillus subtilis</i>	Diversos	<i>Cercospora</i>	Avogreen- pó-molhável	Ocean Agriculture, África do Sul
<i>Pseudomonas syringae</i> ESC-10 e <i>Pseudomonas syringae</i> ESC-11.	Maça, pêra, citros, cereja, batata e batata doce	<i>Penicillium expansum</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Mucor piriformis</i> , <i>Helminthosporium</i> , <i>Penicillium italicum</i> , <i>Penicillium digitatum</i> , <i>Rhizopus stolonifer</i>	<u>Biosave<sup>®</sup> 10/11 – pó-molhável</u>	Jet Harvest Solutions, USA
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Pomáceas	<i>Botrytis</i> , <i>Penicillium</i> e <i>Monilia</i>	<u>BoniProtect – pó-molhável</u>	Biofa AG (Bio-farming systems), Alemanha
<i>Cryptococcus albidus</i>	Maça e citros	<i>Botrytis</i> e <i>Penicillium</i>	<u>Yield Plus</u>	Anchor Yeast, Cape Town África do Sul
<i>Metschnikowia fructicola</i>	Morango, uva, citros, batata doce e cenoura	<i>Botrytis</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Rhizopus</i> , <i>Aspergillus</i>	Shemer – po-molhável	Agro green - Israel
<i>Candida sake</i>	Pomáceas	<i>Botrytis</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Monilia</i>	Candifruit	Sipcam, Espanha
<i>Candida oleophila</i>	Citros	<i>Penicillium digitatum</i> ; <i>Penicillium italicum</i> ; <i>Geotrichum candidum</i>	Aspire – pó-molhável	Ecogen-Israel

Aliado à preocupação da sociedade em relação ao ambiente e principalmente a contaminação da cadeia alimentar com os fungicidas sintéticos a procura por produtos naturais tais como conservadores alimentares, extratos vegetais e óleos essenciais para o controle de doenças de plantas, além dos antagonistas, tem crescido nos últimos anos (BETTIOL; GHINI, 2003; BASTOS; ALBUQUERQUE, 2004). A avaliação da atividade antifúngica dos óleos essenciais tem sido comprovada em alguns trabalhos (GOGOI et al., 1997; PITAROKILI et al., 1999; MORAIS et al., 2009). Nesse sentido, Morais et al. (2009) realizaram uma extensa revisão sobre o potencial de óleos no controle de doenças de plantas.

Óleos essenciais são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, com baixo peso molecular, geralmente odoríferas e líquidas, constituídos, na maioria das vezes, por moléculas de natureza terpênica. Em temperatura ambiente apresentam aspecto

oleoso, tendo como principal característica a volatilidade. Apresentam-se geralmente incolores ou levemente amarelados, com sabor ácido e picante, pouco estáveis em presença de luz, calor e ar, além de serem pouco solúveis em água (SIMÕES; SPITZER, 1999; SAITO; SCRAMIN, 2000). Além disso, são constituídos de terpenos com duas ou mais unidades isoprênicas, sendo cada molécula de isopreno formada por cinco átomos de carbono, provenientes da rota do ácido mevalônico ou mevalonato. Porém, há alguns derivados do fenilpropanóides. De acordo com o tamanho da molécula, os terpenóides recebem denominação diferente: compostos formados por duas unidades isoprênicas (C10) são classificados como monoterpenos (e.g. mentol, limoneno, linalol e citral); os compostos formados por três unidades isoprênicas (C15) são classificados como sesquiterpenos ( $\beta$ -selineno e  $\beta$ -cariofileno); compostos formados por quatro unidades isoprênicas (C20) são os diterpenos e os compostos formados por seis unidades isoprênicas (C30) são classificados como triterpenos. Os monoterpenos e os sesquiterpenos são os compostos de ocorrência mais frequente na natureza, sendo os primeiros mais facilmente encontrados (MORAIS et al., 2009).

Diversos estudos utilizando óleos essenciais provenientes de plantas medicinais, condimentares e aromáticas vêm sendo realizados no controle de fitopatógenos. Apresentam duas características importantes: a primeira é a sua origem natural e a segunda é a presença de baixo risco para o desenvolvimento de microorganismos patogênicos resistentes (DAFERERA et al. 2003; MORAIS et al., 2009). Morais et al. (2009) discutem a eficiência de numerosos óleos essenciais no controle de patógenos em pós-colheita, como *P. digitatum*, *P. italicum*, *B. cinerea*, *M. fruticola* e outros. Dentre esses óleos destacam-se os obtidos de *Origanum vulgare* (orégano), *Thymus captatus* (tomilho), *Origanum dictamnus*, *Origanum manjorana* (manjerona), *Lavandula angustifolia* (lavanda), *Rosmarinus officinalis* (alecrim), *Salvia fruticosa* (sálvia) e *Mentha pullegium* (poejo).

Óleos essenciais extraídos de folhas de *Cymbopogon citratus*, *Ageratum conizoides*, *Alpinia carinata*, *Citrus aurantifolia*, *Eupatorium cannabinum*, *Hyptis suaveolens*, *Juniperus communis*, *Mentha viridis* e *Pinus* spp.; talo de *Boswellia serrata*; casca de *C. reticulata* e *C. sinensis*; rizoma de *Curcuma longa* e raiz de *Vetiveria zizanioides* foram avaliados quanto à inibição do crescimento micelial de *Aspergillus flavus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Fusarium* e *Botrytis* por Mishra e Dubey (1994). Os autores verificaram que 3000 ppm do óleo essencial de *C. citratus* (capim limão), rico em citral, inibiu o crescimento de *A.*



*flavus*. Verificaram ainda a inibição total do crescimento de *Penicillium*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Aspergillus* e *Botrytis* na concentração de 1500 ppm.

Plaza et al. (2004) avaliaram o potencial de 33 óleos essenciais *in vitro* para o controle de doenças em pós-colheita de citros e desses *Origanum vulgare*, *Thymus captatus*, *Eugenia caryophyllata* e *Cinnamomum zeylanicum* apresentaram potencial em controlar os patógenos. Entretanto, quando aplicados diretamente sobre os frutos de laranja até a concentração de 50.000 ppm não controlaram significativamente o bolor verde e o azul dos citros. Além disso, diversos apresentaram problemas de fitotoxicidade.

Segundo Morais et al. (2009), por produzirem importantes micotoxinas em diversos alimentos em pós-colheita, *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* são os principais patógenos estudados na busca de óleos essenciais com capacidade de controlar o crescimento dos mesmos nos alimentos.

Para tratamento de frutos em pós-colheita com óleos essenciais é de extrema importância que não alterem cor e sabor dos alimentos.

A utilização de conservadores alimentares, como sorbato de potássio, benzoato de potássio e de sódio, propionato de sódio, acetato de sódio, carbonato de sódio e de cálcio, bicarbonato de cálcio e de sódio entre outros foi demonstrada como possível em tratamento de frutos em pós-colheita por Franco e Bettiol (1999) e Torres et al. (2008).

#### **2.4 Controle biológico e alternativo de citros em pós-colheita**

Tradicionalmente a forma de controlar as principais doenças do citros tem sido mediante o emprego de fungicidas sistêmicos, por ser de fácil aplicação, ser preciso e eficiente. Seu uso prolongado e descontrolado tem gerado uma série de problemas como o aparecimento de cepas do patógeno resistentes a ação dos fungicidas, aparecimento de doenças iatrogênicas e a presença de resíduos nos frutos. Por todas essas razões, são cada vez mais necessárias medidas alternativas para o controle dessas doenças.

Franco e Bettiol (2002), visando ao controle alternativo de *P. digitatum* e *P. italicum* em citros, testaram dez produtos alternativos individualmente e trinta e cinco combinações desses produtos dois a dois e compararam com o fungicida tiabendazole e testemunha com e sem inoculação. Os produtos testados não apresentaram efeito de sinergismo, exceto a mistura carbonato de Na + ácido bórico. Carbonato de Na e ácido bórico controlaram a

doença em 78 e 87%, respectivamente, sendo que para a mistura, o controle foi de 93%. Destacaram-se, ainda no controle, o bicarbonato de Na, metabissulfito de Na e as misturas de bicarbonato de sódio + ácido bórico, carbonato de Na + carbonato de K, carbonato de Na + sorbato de K, bicarbonato de Na + carbonato de Na, controlando 92; 77; 81; 77; 75 e 71%, respectivamente. O tiabendazole utilizado como padrão controlou totalmente a doença.

Plaza et al (2004) avaliaram o efeito *in vivo* e *in vitro* da atividade antifúngica de vinte óleos essenciais no controle do bolor verde (*P. digitatum*) e bolor azul (*P. italicum*) em citros nas concentrações de 10, 100 e 1000 µl/mL. Entre os óleos testados estavam os óleos de manjerona (*Origanum majorana*), geranio (*Pelargonium graveolens*), orégano (*Origanum vulgare*), lavanda (*Lavandula angustifolia*) e citronela (*Cymbopogon citratus*). Esses inibiram o crescimento fungico dos dois patógenos, entretanto não foram eficientes *in vivo*.

Smilanick et al. (1999) observaram que a imersão de frutas cítricas em soluções de bicarbonato e carbonato de sódio reduziu a incidência do bolor verde em pós-colheita causado por *P. digitatum*. A inibição da germinação dos conídios de *P. digitatum* foi estudada pelo método do flavedo por Franco & Bettiol (2000). Esses autores verificaram que a porcentagem de inibição da germinação de conídios de *P. digitatum* com tiabendazole a 0,15%, bicarbonato de Na a 3% e carbonato de Na a 1% foram de 18; 95 e 96%, respectivamente. Para o metabissulfito de Na a 1%, o sorbato de K a 1%, o carbonato de K a 1% e o ácido bórico a 1% na inibição da germinação dos conídios foi de 100%. Franco e Bettiol (2002) verificaram que esses produtos apresentaram controle do bolor verde em frutos de citros.

Leveduras dos gêneros *Pseudozyma* e *Rhodosporidium* têm sido descritas como potenciais agentes de biocontrole de diversos fungos fitopatogênicos. A atividade antagonista de leveduras destes gêneros e de gêneros relacionados foi testada contra espécies *Penicillium* importantes na deterioração pós-colheita de frutos. O potencial desses antagonistas foi avaliado em ensaios realizados em maçãs e laranjas (ALVES, 2007). Compostos voláteis produzidos por *Saccharomyces cerevisiae* inibiram a expressão de sintomas em frutos de *C. sinensis* var. Valência, quando tratados em pós-colheita, sendo que os compostos orgânicos voláteis, 2-metil-1-butanol e 3-metil-1-butanol apresentaram inibição sobre *Guignardia citricarpa* *in vitro* e atuaram como agentes de controle, inibindo o aparecimento de novas lesões em frutos de laranja Valência (TOFFANO 2010).

Arras et al., (1998), utilizando cepas de *Pichia guilliermondi* e *Candida sake*, reduziram a infecção por *Penicillium italicum* em 86 e 98% em frutas cítricas,

respectivamente. Arras, Demontis e Sussarellu (1996) mostraram resultados satisfatórios contra *Penicillium digitatum* utilizando *Metschnikowia pulcherrima* (cepas 1A e 5A) isolada de figo e *Rhodotorula glutinis* (21A) de tomate, aplicados em laranja e limão artificialmente lesados, com média de inibição de 97,5% (1A), 97,0% (5A) e 92,8% (21A), permanecendo viáveis entre -15 e 60°C e pH 3 a 8. Droby et al. (1999) relataram o crescimento e a eficiência antagônica de *Pichia anomala* sobre a germinação dos esporos de *Penicillium digitatum* isolados de pomelo. Alguns isolados da levedura inibiram em 70% ou mais a infecção por *P. digitatum*; outros foram capazes até mesmo de proteger integralmente o fruto da infecção pelo fungo. Pimenta et al. (2008) avaliaram a capacidade da levedura *Saccharomycopsis schoenii* (UWO-PS 80-91) em controlar o crescimento dos fungos fitopatogênicos *Penicillium expansum* (UFMG 01-2002), *P. italicum* (LCP 61.1199) e *P. digitatum* (LCP 984263, LCP 68175 e LCP 4354) e verificaram que a levedura reduziu a severidade da doença em laranjas inoculadas com todos os fitopatógenos testados. Entre estes fitopatógenos, *P. digitatum* LCP4354 apresentou a maior virulência enquanto que *P. digitatum* LCP 68175 foi o mais suscetível à predação. A levedura foi capaz de permanecer viável, sem produzir lesões na superfície dos frutos por 21 dias. Outra característica desejável observada foi a ausência de produção de substâncias antagonistas. Evidenciando potencial de utilização da levedura *S. schoenii* no controle biológico de doenças pós-colheita em laranjas.

Almeida, Costa e Kupper (2006) estudaram o potencial de *Saccharomyces cerevisiae* e de *Bacillus subtilis* no crescimento micelial e na germinação de *P. digitatum* e *P. italicum* e verificaram que o isolado ACB-84 (*B. subtilis*) e os isolados K-1 e CR-1 (*S. cerevisiae*) foram os mais eficientes como agentes de biocontrole. Toffano (2005) verificou o efeito antifúngico do extrato do albedo sobre *G. citricarpa*. Ainda no mesmo estudo foi possível observar que o extrato aquoso do albedo (*C. sinensis*), flavedo (*C. aurantifolia*), *Lentinulus edodes* e *Agaricus blazei* diminuíram o aparecimento de novas lesões causadas por *G. citricarpa*. Porém, não apresentaram efeitos sobre *P. digitatum* e *C. gloeosporioides* em frutos de *C. sinensis* var. Valência quando tratados em pós-colheita.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado nos Laboratórios de Microbiologia Ambiental e de Produtos Naturais da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna- SP.

#### 3.1 Extração dos óleos essenciais

Os óleos essenciais de *Pogostemon cablin* (patchouli) *Mentha arvensis* (menta), *Cymbopogon citratus* (citronela), *Ocimum basilicum* var. Maria bonita, *Rosmarinus officinalis* (alecrim), *Eucalyptus* spp. (eucalipto), *Lippia sidoides*, *Zingiber officinale* (gengibre), *Citrus aurantifolia* (limão thaiti), *Piper aduncum* (pimenta de macaco) e *Ocimum basilicum* (Manjericão) foram extraídos por hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger modificado, por um período de 4h (Figura 1). Os óleos fixos de *Allium sativum* (alho), *Copaifera langsdorffii* (copaíba), *Azadirachta indica* (nim), *Coffea arabica*-cru e *Coffea arabica*-torrado (café) foram obtidos no comércio, Instituto Agrônomo de Campinas, cedido pelo Dr. Nilson Borlina Maia, Universidade Federal do Ceará- Dr. Sergio Horta, Fiocruz e Laboratório de Produtos Naturais da Embrapa Meio Ambiente onde foram feitos os processos de extração.

O tempo de extração foi otimizado por teste preliminar, observando-se o volume de óleo essencial a cada 30 minutos, considerando-se como tempo ótimo, quando não foi observada alteração do mesmo. Após a separação das fases (água e óleo essencial) (Figura 2), os óleos essenciais extraídos foram transferidos para frascos de vidro âmbar. Os vidros contendo óleo foram embrulhados em papel alumínio e mantidos em freezer para não ocorrer degradação dos seus compostos químicos.

A análise química dos componentes dos óleos essenciais foram realizadas no cromatógrafo a gás acoplado à espectrômetro de massas (CG/EM), modelo QP5050A, marca Shimadzu, equipado com o software CLASS 5000, coluna cromatográfica tipo capilar de sílica - DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) e hélio (56,9 KPa) como gás carreador, com fluxo de 1 mL/min, split 1:20. As temperaturas do injetor e da interface foram de 240 °C e 260 °C, respectivamente. O programa de aquecimento da coluna foi de: temperatura inicial 60 °C, aumentando 3 °C/min até 240 °C. A amostra de óleo essencial (1 µL) foi diluída em acetato de etila (1 mL) e o volume injetado foi de 1 µL. A identificação dos componentes foi realizada utilizando-se a injeção de mistura padrão de 24 hidrocarbonetos (n-alcenos) com C8 a C32, para cálculo do Índice de Retenção (IR) conforme equação de Van den Dool e Kratz (VAN DEN DOOL e KRATS, 1963; FERRACINI, 1995):

$$IR = [(T_s - T_{cn-1}) / (T_{cn} - T_{cn-1}) \times 100] + 100 \times C_{n-1} \quad (1);$$

onde:  $T_s$ : Tempo de retenção da substância analisada;  $T_{cn}$ : Tempo de retenção do n-alceno que elui após a substância analisada.  $T_{cn-1}$ : Tempo de retenção do n-alceno que elui antes da substância analisada;  $C_{n-1}$ : n-alceno que elui antes da substância analisada

Após a obtenção do Índice de Retenção para cada composto foi realizada a comparação destes e dos espectros de massas. Os dados quantitativos foram obtidos por integração eletrônica da área dos picos (TIC).

### 3.1.2 Obtenção dos agentes de biocontrole

Os agentes de biocontrole estudados foram: *Bacillus subtilis* (Serenade®), mistura de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* (Nemix®), *Pichia guilliermondii* (L29), *Sporobolomyces roseus* (L41), *Rhodotorula mucilagenosa* (L17), *Sporodiobolus pararoseus*, *Pichia* spp. (L4-1), *Debaryomyces hansenii* (L62), *Pichia membranifaciens* (L21) e uma bactéria isolada diretamente de frutos de laranja pera. As leveduras, com exceção de *S. pararoseus* que foi isolada por Machado e Bettiol (2010), as demais foram gentilmente cedidas pela Embrapa Uva e Vinho pelo Dr. Lucas Garrido. As leveduras foram preservadas em meio de extrato de malte. Os produtos comerciais foram utilizados na formulação pó-molhável obtidas diretamente no mercado. As leveduras foram multiplicadas em meio extrato de malte com incubação a  $25 \pm 2^\circ$  C até o aparecimento de

colônias. As suspensões foram preparadas utilizando água destilada esterilizada para obter a concentração de  $1 \times 10^8$  UFC/mL<sup>-1</sup>.

### **3.2 Isolamento e teste de patogenicidade de *Penicillium digitatum* e *Guignardia citricarpa***

Para obtenção e seleção de um isolado de *Penicillium digitatum* foram realizados isolamentos a partir de laranja “Pera” apresentando sintomas de bolor verde, coletadas no município de Jaguariúna, SP. Dos frutos com sintomas característicos do bolor verde, procedeu-se o isolamento direto pela remoção e transferência dos conídios presentes na superfície do tecido infectado dos frutos para placas contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA). Em seguida, as placas foram mantidas a  $25 \pm 2$  °C até o aparecimento de colônias bem definidas do fungo, com repicagens subsequentes em BDA até a obtenção de colônias puras de *Penicillium digitatum*.



**Figura 1.** Sistema de hidrodestilação utilizado na extração de óleos essenciais. a) Manta aquecedora, b) balão volumétrico, c) clevenger, d) condensador e e) mangueiras de aferrecimento.



**Figura 2.** Separação da fase aquosa do óleo essencial. a) óleo essencial de *Citrus aurantifolia* e b) Fase aquosa.

Três isolados de *P. digitatum* foram previamente selecionados levando-se em consideração o hospedeiro (laranja “Pera”) coletado em pomar de frutas cítricas. Três isolados de laranja Pêra (PD 01/08, PD 02/08 e PD 03/08) foram primeiramente retirados dos tubos de preservação e transferidos para placas contendo BDA. Em seguida, para induzir boa esporulação, foram incubados na temperatura de  $25 \pm 2$  °C, com alternância de luz fluorescente (12/12h) pelo período de sete dias. Suspensões de conídios de *P. digitatum* foram preparadas colocando-se água destilada esterilizada nas placas com a cultura do fungo e com auxílio de uma alça de Drigalsky promoveu-se a formação de suspensão de conídios. A suspensão foi filtrada em gaze dupla esterilizada e diluída até a concentração de, aproximadamente,  $1 \times 10^6$  conídios/mL, determinado pela contagem em câmara de Neubauer. Para melhor dispersão dos conídios na suspensão, adicionou-se Tween 80% na proporção de 0,05% da suspensão.

Frutos maduros de laranja Pera, provenientes de Jaguariúna/SP, foram desinfestados superficialmente pela imersão em solução de hipoclorito de sódio (0,5%) durante três minutos e em seguida lavados duas vezes em água destilada esterilizada. Os frutos foram dispostos sobre papel absorvente ao ar livre para secagem da água superficial e em seguida colocada em bandeja de papelão. Para a inoculação de *P. digitatum* foram realizados ferimentos (10 mm de diâmetro X 5 mm de profundidade) em dois pontos equidistantes na região equatorial do fruto com auxílio de uma ponteira descartável de micropipeta esterilizada. Em cada ferimento foram depositados 50 µL da suspensão de conídios com auxílio de uma micropipeta. Água destilada esterilizada foi utilizada nos frutos testemunha. Nesse ensaio cada isolado foi considerado como um tratamento e foram utilizados dez frutos por isolado. A incubação foi a  $\pm 25$  °C durante quatro dias, ocasião em que foram feitas as avaliações da incidência, seguindo-se o reisolamento e identificação. Os isolados foram preservados pelo método de Castellani. O isolado de *P. digitatum* PD 02/08, utilizado nos ensaios descritos a seguir foi selecionado sendo multiplicado em meio BDA e incubado a  $25 \pm 2$  °C com alternância de luz (12/12h) por sete dias.

Os isolados de *Guignardia citricarpa* foram obtidos de frutos sintomáticos de laranjas da variedade Pêra coletados no município de Jaguariúna, SP. O fungo foi isolado de lesões típicas de mancha preta dos citros, a partir de 10 frutos. Para isso, os frutos foram desinfestados superficialmente por meio de lavagem por 30 segundos em etanol 70%, 1 minuto em hipoclorito de sódio 2% e 1 minuto em água destilada esterilizada. Após a



desinfestação superficial, *G. citricarpa* foi isolado em meio batata-dextrose-ágar (BDA). As placas foram mantidas a 28 °C e avaliadas depois de três dias. Extremidades das hifas de colônias morfológicamente semelhantes ao gênero *Guignardia* foram coletadas e repicadas para meio BDA, purificadas e preservadas pelo método de Castellani.

### 3.3 Efeito de óleos essenciais na inibição da germinação de conídios de *Penicillium digitatum*

Epidermes de cebola foram cortadas em discos de 12 mm de diâmetro com furador de rolha metálico, sendo que três discos foram colocados na superfície de uma lâmina de vidro de microscopia plana (FRANCO; BETTIOL, 2002). Como inóculo foram utilizados conídios do *P. digitatum*, isolado PD 02/08, com sete dias de idade, suspensos em água destilada esterilizada acrescida de 0,015% de Tween 80. A concentração do inóculo foi calibrada para  $1 \times 10^5$  conídios/mL, em câmara de Neubauer. Sobre a epiderme de cebola foram depositados 20 µL do inóculo em cada disco e a seguir colocado mais 20 µL da suspensão de óleos essenciais em diversas concentrações e água destilada esterilizada sobre cada gota do inóculo. Foram utilizadas cinco lâminas, as quais após receberem a suspensão de conídios foram mantidas em câmara úmida a  $25 \pm 2$  °C. A germinação foi avaliada em uma lâmina por tratamento, as quais, após período de incubação de 16, 19, 20, 21 e 22 horas, pela observação em microscópio ótico com aumento de 200x em dez campos por lâmina. A porcentagem de germinação foi determinada com base no número de conídios germinados e o total de conídios no campo. Antes de realizar a leitura, em cada um desses períodos, foi adicionada uma gota de azul de lactofenol sobre cada gota de inóculo. O conídio foi considerado germinado quando o seu tubo germinativo apresentava tamanho igual ou superior ao maior diâmetro do conídio.

Os óleos essenciais de *Pogostemon cablin* (patchouli), *Mentha arvensis* (menta), *Cymbopogon citratus* (citronela), *Ocimum basilicum* var. Maria bonita, *Rosmarinus officinalis* (alecrim), *Eucalyptus* spp. (eucalipto), *Lippia sidoides*, *Zingiber officinale* (gengibre), *Citrus aurantifolia* (limão thaiti), *Piper aduncum* (pimenta de macaco) e *Ocimum basilicum* (manjeriço) foram extraídos por hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger modificado, por um período de 4h (Figura 1). Os óleos fixos de *Allium sativum* (alho), *Copaifera langsdorffii* (copaíba), *Azadirachta indica* (nim), foram estudados quanto a potencial de inibir a

germinação de esporos. Também foram incluídos o fungicida Thiabendazole Tecto® e água como testemunha absoluta. Os agentes de biocontrole *Bacillus subtilis* (Serenade®), *Bacillus subtilis* e *Bacillus lechiformes* (Nemix®), *Pichia guilliermondii* (L29), *Sporobolomyces roseus* (L41), *Rhodotorula mucilagenosa* (L17), *Sporodiobolus pararoseus*, *Pichia* sp. (L4-1), *Debaryomyces hansenii* (L62), *Pichia membranifaciens* (L21), bactéria isolada da laranja e Testemunha absoluta também foram avaliados.

Para cada tratamento foram utilizadas três lâminas, as quais após receberem as suspensões de conídios (20 µL) e dos óleos (20 µL) nas concentrações de 5, 50, 500, 5000, 50.000 e 500.000 mL.L<sup>-1</sup>, estes foram diluídos em água e acrescentada uma gota de detergente neutro. As lamina foram mantidas em câmara úmida escura a 25±2 °C. Os antagonistas foram testados nas concentrações de 1x10<sup>5</sup> a 1x10<sup>8</sup> conídios/mL. E para as bactérias utilizada 1x10<sup>8</sup> UFC/mL<sup>-1</sup>. A germinação dos conídios foi avaliada em uma lâmina de cada tratamento, após o período de incubação de 21 horas pela observação (aumento de 200 vezes) de dez campos por lâmina, contando-se o total de conídios no campo e o número de conídios germinados. Para realizar a leitura foi adicionada uma gota de azul de lactofenol sobre a gota do inóculo. O conídio foi considerado germinado quando o seu tubo germinativo apresentava tamanho igual ao diâmetro do conídio. Com os dados foi calculada a porcentagem de inibição da germinação dos conídios para cada tratamento.

### **3.4 Controle de *Penicillium digitatum* em laranja com óleos fixos, óleos essenciais e agentes de biocontrole**

Com o objetivo de selecionar produtos alternativos aos fungicidas para o controle de *Penicillium digitatum* em pós-colheita de citros foram realizados vários ensaios em laranja ‘Pera’. Os ensaios foram realizados separadamente para grupos de produtos. O isolado PD 02/08 de *P. digitatum* foi repicado para placas com BDA e incubado a 25± 2 °C com alternância de 12 horas de luz e escuro por sete dias. Uma suspensão de conídios 1x10<sup>5</sup> conídios/mL foi preparada a partir destas colônias empregando-se a mesma metodologia descrita anteriormente. As laranjas foram adquiridas em galpão de embalagem no estágio fisiológico

maduro, antes de receber qualquer tratamento pós-colheita. Os frutos foram lavados em solução de hipoclorito de sódio a 0,5% por três minutos e enxaguados duas vezes em água de torneira. Após a secagem, os frutos foram colocados em bandejas de papelão identificadas.

Nesse estudo foram utilizados os seguintes óleos essenciais de *Pogostemon cablin* (patchouli) *Mentha arvensis* (menta), *Cymbopogon citratus* (citronela), *Ocimum basilicum* var. Maria bonita, *Rosmarinus officinalis* (alecrim), *Eucalyptus* spp. (eucalipto), *Lippia sidoides*, *Zingiber officinale* (gengibre), *Citrus aurantifolia* (limão Thaiti), *Piper aduncum* (pimenta de macaco) e *Ocimum basilicum* (manjeriço) foram extraídos por hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger modificado, por um período de 4h (Figura 1). Os óleos fixos de *Allium sativum* (Alho), *Copaifera langsdorffii* (copaíba), *Azadirachta indica* (nim). Nesses óleos foi acrescentada uma gota de detergente para melhor uniformização. Os agentes de biocontrole *Bacillus subtilis* (Serenade®), *Bacillus subtilis* e *Bacillus lechiformes* (Nemix®), *Pichia guilliermondii* (L29), *Sporobolomyces roseus* (L41), *Rhodotorula mucilagenosa* (L17), *Sporodiobolus pararoseus*, *Pichia* spp. (L4-1), *Debaryomyces hansenii* (L62), *Pichia membranifaciens* (L21), bactéria isolada da laranja e testemunha absoluta também foram analisados. Todos foram comparados com o fungicida Tecto® concentração recomendada, testemunha absoluta e testemunha inoculada.

Cada tratamento foi composto por dez frutos feridos com um tubo vazado (3 mm de diâmetro), em dois pontos opostos na região equatorial do fruto, a uma profundidade de mais ou menos dois milímetros, atingindo a região do albedo. Após o ferimento os frutos foram inoculados com 20 µl da suspensão do patógeno a  $1 \times 10^7$  conídios/mL. Em seguida, em cada ferimento, foram aplicados 20 µl da suspensão dos óleos trocando-se as ponteiros descartáveis esterilizadas. Para o tratamento testemunha com inoculação colocou-se 20 µl de água destilada esterilizada. No tratamento testemunha sem inoculação colocou-se 40 µl de água destilada esterilizada em duas aplicações de 20µl.

Os óleos fixos e essenciais e os micro-organismos testados foram aplicados preventivamente (24 h antes da inoculação do patógeno), simultaneamente à inoculação do patógeno e de forma curativa (24 h após a inoculação do patógeno). Os óleos foram estudados nas concentrações de 1, 10, 100, 1000, 10.000 e 100.000 mL.L<sup>-1</sup>, enquanto os antagonistas foram testados nas concentrações de  $1 \times 10^5$  a  $1 \times 10^8$  conídios/mL. Os frutos foram incubados em uma sala em condições ambiente, na temperatura de  $25 \pm 2$  °C, umidade relativa de 85-90% e fotoperíodo de 12/12 horas. As informações foram medidas e registradas em

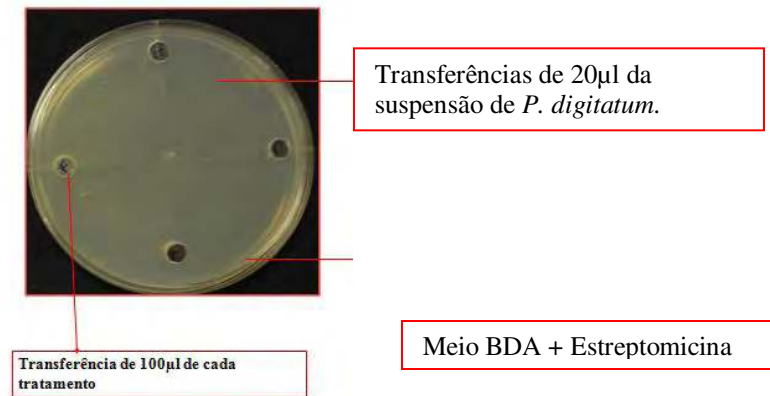
termohigrógado, além de observações diárias em um termômetro de máxima e mínima. Durante o armazenamento foram avaliadas a incidência e a severidade da doença e presença de efeito fitotóxico. As avaliações foram realizadas a cinco, seis e sete dias após a inoculação.

Em cada ferimento foi medido com auxílio de uma régua flexível, o diâmetro médio da lesão nas posições horizonte e vertical, acompanhando a curvatura de fruto. Para cada ensaio, também foi medido a altura de dez laranjas com uma régua flexível acompanhando o seu formato. A severidade da doença foi calculada a partir do diâmetro médio das lesões de cada tratamento, descontando-se do diâmetro do ferimento. A porcentagem de controle da doença foi calculada a partir do diâmetro médio das lesões de cada tratamento, descontando-se os 3 mm do diâmetro do ferimento, em comparação com a testemunha.

### **3.5 Efeito dos produtos alternativos na inibição do crescimento micelial de *Penicillium digitatum in vitro***

Para o experimento foram preparadas placas contendo meio BDA com estreptomicina, no meio foram transeferidos 20 µl da suspensão de  $10^5$  conídios/ml do patógeno, aguardou-se até que a superfície estivesse seca para começar a fazer a escavação do meio, que foi feita com o auxílio de um cilindro de cobre de 7 mm de diâmetro (Figura 3). Foi feito um orifício em cada placa e depositada uma alíquota de 100 µl dos seguintes óleos essenciais de *Pogostemon cablin* (patchouli) *Mentha arvensis* (menta), *Cymbopogon citratus* (citronela), *Ocimum basilicum* var. Maria bonita, *Rosmarinus officinalis* (alecrim), *Lippia sidoides*, *Zingiber officinale* (gengibre), *Eucalyptus* spp. (eucalipto), *Citrus aurantifolia* (limão Thaiti), *Piper aduncum* (pimenta de macaco) e *Ocimum basilicum* (manjeriçã) foram extraídos por hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger modificado, por um período de 4h (Figura 1). Os óleos fixos de *Allium sativum* (alho), *Copaifera langsdorffii* (copaíba), *Azadirachta indica* (nim). Os agentes de biocontrole *Bacillus subtilis* (Serenade®), *Bacillus subtilis* e *Bacillus lechiformes* (Nemix®), *Pichia guilliermondii* (L29), *Sporobolomyces roseus* (L41), *Rhodotorula mucilagenosa* (L17), *Sporodiobolus pararoseus*, *Pichia* sp. (L4-1), *Debaryomyces hansenii* (L62), *Pichia membranifaciens* (L21), bactéria isolada da laranja e testemunha absoluta também foram analisados. Todos foram comparados com o fungicida Tecto® concentração

recomendada, testemunha absoluta e testemunha inoculada. As concentrações de óleos estudadas foram 0, 1, 10, 100, 1000, 10.000 e 100.000 mL.L<sup>-1</sup>, enquanto os antagonistas foram testados na concentração de  $1 \times 10^8$  UFC/mL. A incubação foi a  $25 \pm 2$  °C até o aparecimento de colônias e posterior aparecimento de halos.



**Figura 3.** Esquema de preparação do experimento para avaliar o efeito de óleos fixos e essências, bem como agentes de biocontrole na inibição do crescimento de *Penicillium digitatum*.

### 3.6 Ação fungicida e fungistática dos óleos fixos e essenciais sobre *P. digitatum*

Para comprovar a ação fungicida ou fungistática, tanto dos óleos fixos quanto dos essenciais, foram preparados meios de cultura BDA em tubos de ensaio, sendo que este ficou inclinado para posterior transferência do isolado do ensaio. Foi realizada a técnica de estriamento em cada tubo contendo o meio de cultura, coletando-se o patógeno *P. digitatum* do experimento 3,5 e de sua respectiva dose. Cada concentração foi constituída de três repetições. A avaliação feita tomando por base o crescimento da testemunha absoluta.

### 3.7 Efeito dos óleos essenciais e fixos e antagonistas no controle de *Guignardia citricarpa* em frutos de laranja ‘Pera’

No ensaio com *G. citricarpa* foram utilizados frutos naturalmente infestados e coletados no campo e apresentando sintomas da doença. Após a desinfestação superficial, os frutos foram mergulhados, separadamente, por 5 minutos em suspensão contendo  $1 \times 10^8$  cfu/mL de *Bacillus subtilis* (Serenade®), *Bacillus subtilis* e *Bacillus lichiniiformes* (Nemix®), *Pichia guilliermondii* (L29), *Sporobolomyces roseus* (L41), *Rhodotorula mucilagenosa* (L17), *Sporodiobolus pararoseus*, *Pichia* sp. (L4-1), *Debaryomyces hansenii* (L62), *Pichia membranifaciens* (L21), bactéria da laranja; e os óleos essenciais de *Pogostemon cablin* (Patchouli) *Mentha arvensis* (Menta), *Cymbopogon citratus* (Citronela), *Ocimum basilicum* var. Maria bonita, *Rosmarinus officinalis* (Alecrim), *Lippia sidoides*, *Zingiber officinale* (Gengibre), *Citrus aurantifolia* (Limão Thaiti), *Piper aduncum* (pimenta de macaco), *Ocimum basilicum* (manjeriçã) e *Eucalyptus* spp. (eucalipto), foram extraídos por hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger modificado, por um período de 4h (Figura 1). Os óleos fixos de *Allium sativum* (alho), *Copaifera langsdorffii* (copaíba), *Azadirachta indica* (nim). Além desses produtos foram estudados o efeito do fungicida Tecto®; sendo todos comparados com a Testemunha absoluta. Todos os produtos foram estudados nas mesmas concentrações relatadas anteriormente.

Em seguida, os frutos foram dispostos sobre papel absorvente ao ar livre para a secagem. Depois de secos, foram acondicionados em bandejas de papelão e incubados à  $25 \pm 2$  °C e umidade relativa média de 78%. Foi realizada uma avaliação inicial e a cada quatro dias fez-se a contagem de novas lesões que surgiam nos frutos. Para cada tratamento foram utilizados 10 frutos, considerados uma repetição. Ao final de 16 dias foram realizadas avaliações da evolução da doença em relação à avaliação inicial.

### **3.8 Efeito dos produtos alternativos na inibição de *Guignardia citricarpa* in vitro**

Para o experimento foram preparadas placas contendo meio BDA e adicionado estreptomomicina, a estas foram transferidos 200 µl da suspensão de  $10^5$  conídios/ml do patógeno, aguardou-se até que a superfície estivesse seca para fazer a escavação do meio com o auxílio de um cilindro de cobre de 7mm de diâmetro. Foi feito um orifício em cada placa, e uma alíquota de 100 µl dos óleos essenciais de *Pogostemon cablin* (patchouli) *Mentha arvensis* (Menta), *Cymbopogon citratus* (Citronela), *Ocimum basilicum* var. Maria bonita, *Rosmarinus officinalis* (Alecrim), *Lippia sidoides*, *Zingiber officinale* (Gengibre), *Citrus aurantifolia* (Limão

Thaïti), *Eucalyptus* spp. (eucalipto), *Piper aduncum* (pimenta de macaco) e *Ocimum basilicum* (Manjerição) foram extra idos por hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger modificado, por um período de 4h (Figura 1). Os  leos fixos de *Allium sativum* (alho), *Copaifera langsdorffii* (copaíba), *Azadirachta indica* (nim). Além dos óleos, também foram estudados os seguintes agentes de biocontrole: *Bacillus subtilis* (Serenade ), *Bacillus subtilis* e *Bacillus lichiniiformes* (Nemix ), *Pichia guilliermondii* (L29), *Sporobolomyces roseus* (L41), *Rhodotorula mucilagenosa* (L17), *Sporodiobolus pararoseus*, *Pichia* sp. (L4-1), *Debaryomyces hansenii* (L62), *Pichia membranifaciens* (L21) e uma bactéria isolada diretamente da laranja.

As concentrações de óleos avaliadas foram: 0, 1, 10, 100, 1000, 10.000 e 100.000 ppm. Os microrganismos foram avaliados utilizando a concentração de  $1 \times 10^8$  UFC/mL. As placas foram mantidas a  $25 \pm 2$   C até o aparecimento de colônias e posterior aparecimento de halos.

### **3.9 Efeito dos óleos fixos e essenciais sobre o desenvolvimento dos agentes de biocontrole**

Considerando a possibilidade de formular os agentes de biocontrole com os óleos fixos e essências, haja vista a possibilidade desses óleos agirem com um limitante de desidratação dos frutos, além de um possível efeito sinergístico ou aditivo no controle da doenç a, foram realizados estudos da compatibilidade dos óleos com os agentes de biocontrole. Os  leos essenciais de *Pogostemon cablin* (patchouli) *Mentha arvensis* (menta), *Cymbopogon citratus* (citronela), *Ocimum basilicum* var. Maria bonita, *Rosmarinus officinalis* (alecrim), *Lippia sidoides*, *Zingiber officinale* (gingibre), *Citrus aurantifolia* (limão tha i), *Eucalyptus* spp. (eucalipto), *Piper aduncum* (pimenta de macaco) e *Ocimum basilicum* (manjerição) foram extra idos por hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger modificado, por um período de 4h (Figura 1). Os  leos fixos de *Allium sativum* (alho), *Copaifera langsdorffii* (copaíba), *Azadirachta indica* (Nim), foram avaliados quanto   inibição dos agentes de controle biológico (*Bacillus subtilis* (Serenade ), *Bacillus subtilis* e *Bacillus lichiniiformes* (Nemix ), *Pichia guilliermondii* (L29), *Sporobolomyces roseus* (L41), *Rhodotorula mucilagenosa* (L17), *Sporodiobolus pararoseus*, *Pichia* sp. (L4-1), *Debaryomyces hansenii* (L62), *Pichia membranifaciens* (L21) e uma bactéria da laranja). Para tanto, foram preparadas placas contendo

meio BDA e transferidos 200 µl da suspensão de  $10^5$  conídios/ml do agente de biocontrole, aguardou-se até que a superfície estivesse seca para fazer a escavação do meio com o auxílio de um cilindro de cobre de 7mm de diâmetro. Foi feito um orifício em cada placa e uma alíquota de 100 µl dos óleos nas concentrações de 0, 1, 10, 100, 1000, 10.000 e 100.000 mL.L<sup>-1</sup> foi colocada em cada poço. A incubação foi a 25±2 °C até o aparecimento de colônias e halos e inibição para avaliação do seu diâmetro.

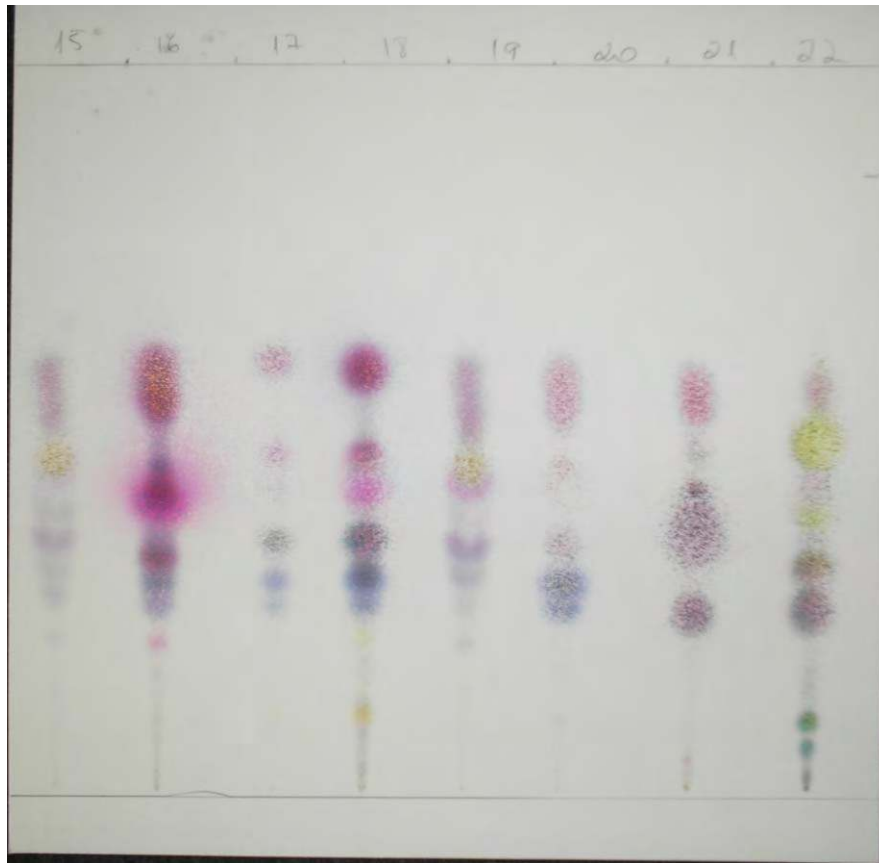
### 3.10 Bioautografia

Para determinar a presença dos compostos nos óleos, 10 µL dos foram aplicadas em cromatoplasmas de sílica GF254 em suporte de alumínio da Merck. Os eluentes escolhidos foram uma mistura de hexano/acetato de etila/metanol (45:45:10) para os óleos fixos e acetato de etila/metanol (90:10) para os óleos essenciais. A avaliação foi feita observando-se a velocidade de migração dos constituintes da mistura e que foram caracterizados por um valor numérico, Rf, que exprime a relação entre as distâncias percorridas pelos óleos e pela frente do solvente.

A bioautografia é um método que combina a CCD (cromatografia em coluna delgada) com bioensaio *in situ*. Este método mostra a localização exata do constituinte ativo de uma matriz complexa. Portanto, é um método eficiente no isolamento biomonitorado pela atividade através de um cromatograma de referência revelado com um reagente cromogênico. O ensaio de determinação da atividade antimicrobiana pelo método de bioautografia foi realizado de acordo com Hamburgter e Hostettmann (1991). Para avaliar a atividade dos compostos presentes no cromatograma, foi transferida uma suspensão de  $10^8$  conídios/mL de *Penicillium digitatum* e *Guignardia citricarpa* e dos agentes de biocontrole (*Bacillus subtilis* (Serenade®), *Bacillus subtilis* e *Bacillus lichiniiformes* (Nemix®), *Pichia guilliermondii* (L29), *Sporobolomyces roseus* (L41), *Rhodotorula mucilagenosa* (L17), *Sporodiobolus pararoseus*, *Pichia* spp. (L4-1), *Derbaryomyces hansenii* (L62), *Pichia membranifaciens* (L21) e uma bactéria da laranja) em meio de cultura líquido e cada um destes microrganismos foi pulverizado sobre o cromatograma. A placa contendo o cromatograma (Figura 4) pulverizado com a suspensão dos fungos testes e também da dos antagonistas foi



observada diariamente, verificando se houve ou não a formação de halo de inibição sobre alguns componentes das frações obtidas pelas cromatografias.



**Figura 4:** Placa de cromatografia em camada para avaliar os constituintes dos óleos que inibiam os fitopatógenos e os agentes de biocontrole.

### 3.11 Análise Sensorial

A avaliação sensorial foi realizada no Laboratório de Microbiologia das Faculdades Metropolitanas Unidas, com o objetivo de avaliar a qualidade da laranja processada após os tratamentos com óleos e antagonistas, por meio da avaliação de atributos sensoriais de aparência, textura e sabor, utilizando o teste de comparação múltipla, conforme Meilgaard et al. (1999). A avaliação sensorial teve início com o treinamento da equipe, composta por 10 provadores, previamente selecionados. Para isso, utilizaram-se diversas amostras de

laranja, procurando simular os principais problemas relacionados às características sensoriais do produto. Foram apresentadas aos provadores amostras do produto com características bastante diversificadas quanto ao frescor (amostras tratadas com os óleos e os microrganismos), quanto à coloração (de verde a vermelho a amarelo), quanto à aparência (sadios e com injúrias), quanto ao sabor (característico e não característico) do produto, a fim de estimular e enriquecer a discussão. Depois de feito o levantamento dos atributos, todas as características descritas por cada membro da equipe foram discutidas objetivando-se chegar ao consenso em relação às expressões que melhor descreviam e caracterizavam o produto, para que fosse preparada a ficha para aplicação dos testes. Posteriormente, a equipe foi treinada na quantificação da intensidade de cada atributo e foram feitas reuniões para familiarizar os provadores com as fichas que foram utilizadas no teste final. Após, foi realizado um último teste sensorial no treinamento utilizando-se as cabines de prova. Foi montado um experimento (pré-teste), com o objetivo de simular os principais problemas relacionados com as características sensoriais que poderiam ocorrer nos frutos durante o período de armazenamento. Os atributos sensoriais avaliados pelos provadores e suas respectivas definições são apresentados na Tabela 2.

Para avaliação dos atributos de aparência cada tratamento foi selecionado ao acaso e dispostos em pequenas bandejas plásticas brancas, que foram apresentadas aos provadores sob iluminação com luz branca. Para avaliação dos atributos de textura e sabor, laranjas de cada tratamento foram disponibilizadas aos provadores para que eles pudessem ver a textura da laranja, bem como as características residuais dos óleos e antagonistas. Após as amostras foram processados o suco destas laranjas e estes foram servidos em copinhos de plástico descartáveis. Os testes foram realizados em cabines individuais de prova. Os provadores utilizaram água mineral para lavar o palato no intervalo entre as amostras e bolachas água e sal.

**Tabela 2:** Atributos sensoriais avaliados pelos provadores e respectivas definições

Termos Descritos	Definições	Material de Referencia
<b>APARÊNCIA</b>		
1- Cor amarela	Tonalidade da cor amarela de suco de laranja natural fresco.	Suco de laranja natural adicionado de três gotas de solução de corante artificial amarelo tartrazina 0,1% 100mL de suco.
2- Partículas/ Células	Presença de partículas fibrosas/ células (bagacinhos) em suspensão no suco de laranja	Adição extra de partículas fibrosas (bagacinhos) ao suco de laranja
3- Viscosidade	Viscosidade percebida visualmente (aparência) por movimentos circulatorios utilizando-se de colher plástica.	Adição extra de partículas fibrosa celular (bagacinhos) ao suco de laranja.
<b>AROMA</b>		
4- Laranja natural	Sensação olfativa associada ao aroma característico de suco de laranja natural fresco	Aroma natural de suco fresco de laranja variedade Pera
5- Laranja fermentada	Sensação olfativa associada ao aroma pouco característico de suco de laranja natural fresco, lembrando a laranja passada e fermentada	Aroma de suco de laranja pasteurizado de marca comercial lembrando a laranja passada.
<b>SABOR</b>		
6- Laranja Natural	Sensação gustativa associada ao sabor característico de suco de laranja natural.	Sabor natural de suco fresco de laranja variedade pêra. Adição de 0,2% de ácido cítrico em suco de laranja natural fresco
7- Laranja fermentada	Sensação gustativa associada ao sabor característico de suco de laranja natural fresco, lembrando a laranja passada e fermentada.	Adição de 0,2% de ácido cítrico em suco de laranja natural.

### **3.13 Análise estatística**

O delineamento experimental em todos os experimentos foi o inteiramente casualizado (DIC), a avaliação dos dados foi efetuada com o auxílio da análise de variância e suas médias comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade, utilizando o programa SISVAR.

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 Isolamento e teste de patogenicidade de *Penicillium digitatum* e *Guignardia citricarpa***

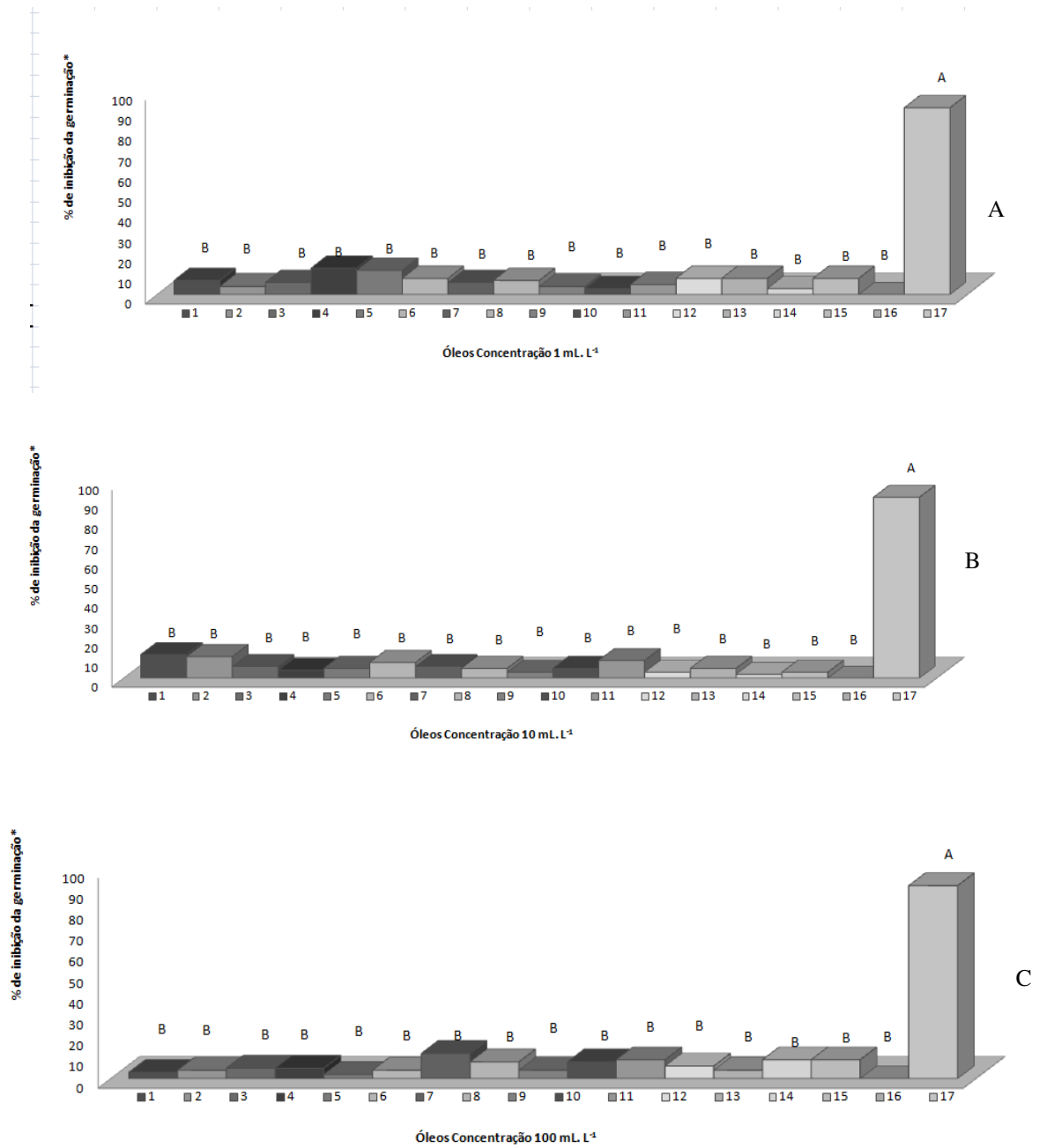
Os três isolados selecionados de *P. digitatum* (PD 01/08, PD 02/08, PD 03/08 ) e dois de *G. citricarpa* (GC 01/08 e GC 02/08) foram patogênicos aos frutos. Sendo assim, os isolados selecionados para os experimentos foram PD 02/08 de *P. digitatum* e GC 01/08 de *G. citricarpa*.

### **4.2 Efeito de óleos essenciais e agentes de biocontrole na inibição da germinação de conídios de *Penicillium digitatum***

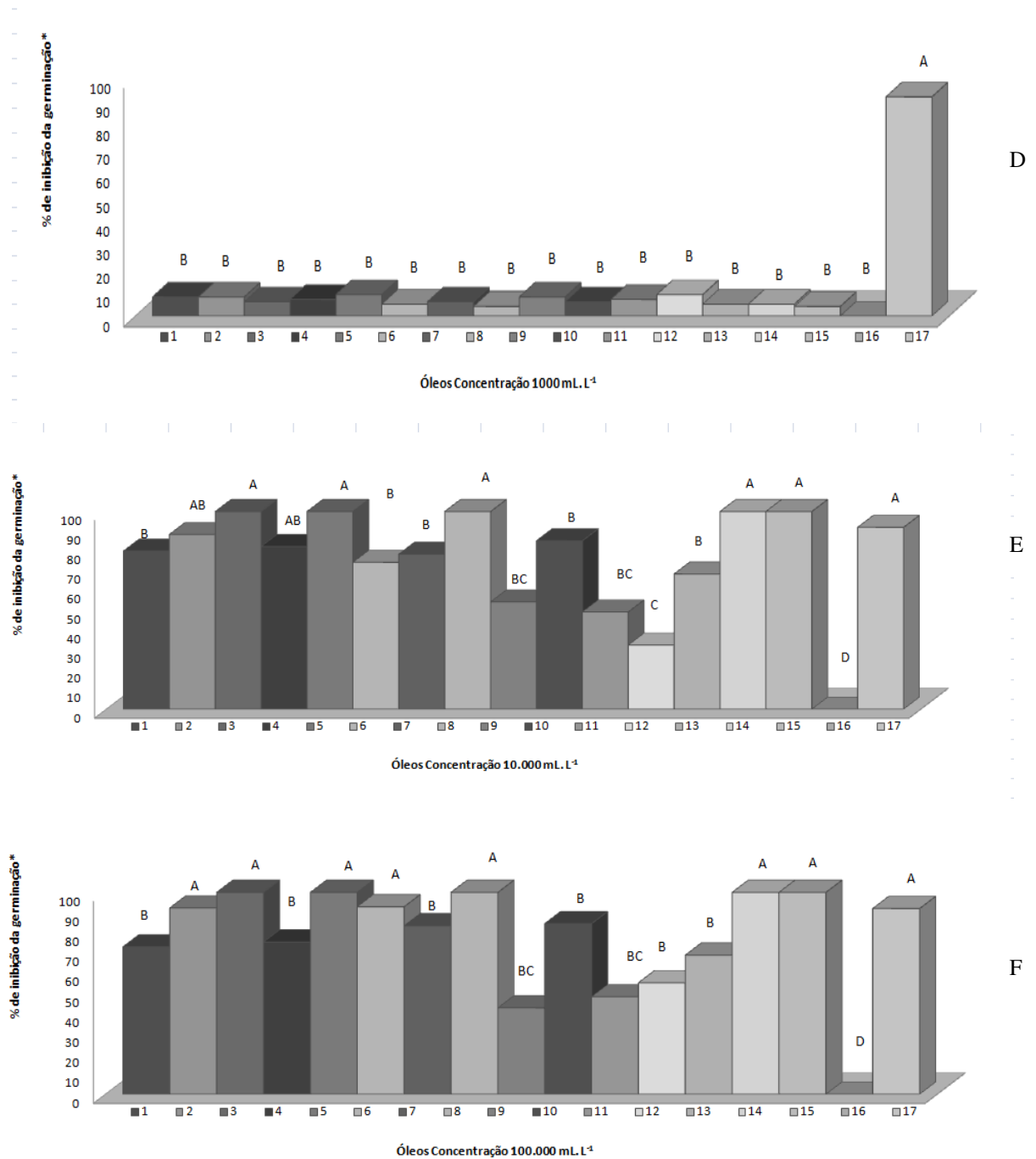
A germinação de conídios de *P. digitatum* foi inibida tanto pelos óleos essenciais de *Pogostemon cablin* (*patchouli*) *Mentha arvensis* (menta), *Cymbopogon citratus* (citronela), *Ocimum basilicum* var. Maria bonita, *Eucalyptus* spp. (eucalipto), *Rosmarinus officinalis* (alecrim), *Lippia sidoides*, *Zingiber officinale* (gengibre), *Citrus aurantifolia* (limão thaiti), *Piper aduncum* (pimenta de macaco) e *Ocimum basilicum* (manjeriçã) quanto pelos óleos fixos de *Allium sativum* (alho), *Copaifera langsdorffii* (copaíba) e *Azadirachta indica* (nim). Esses óleos não diferiram quanto à inibição da germinação de esporos do fungicida padrão

utilizado – Tecto, nas concentrações de 10.000 e 100.000 mL.L<sup>-1</sup> (Figura 5 e 6). Todas as concentrações diferiram da testemunha.

As observações realizadas em microscopia eletrônica revelaram que *C. lindemuthianum* e *R. solani* tratados com o óleo essencial de tomilho apresentaram alterações morfológicas em suas hifas, aparentando colapsadas e pequenas, também foi observada redução na produção de conídios, quando comparados ao controle. Com o óleo essencial de menta foram observadas leves alterações nas hifas e conídios das células de *C. lindemuthianum*. O óleo essencial de lavanda deformou as hifas de *C. lindemuthianum*, *F. solani* e *R. solani*, sendo que nos dois primeiros fungos, observou-se redução no número de conídios produzidos. *P. ultimum* tratado com o mesmo óleo essencial apresentou forte redução no diâmetro das hifas ao ser comparado ao controle, e o surgimento de uma formação filamentosa, consistindo em extravasamento do seu conteúdo citoplasmático (ZAMBONELLI et al., 1996). Esta redução do tamanho das hifas pode ser explicada pela alteração no metabolismo do fungo, causada por uma ação mutagênica de muitos óleos essenciais (ZANI et al, 1991). Os autores discutem que a atividade antifúngica dos óleos essenciais testados advém, provavelmente, do resultado da penetração de quitina na parede das hifas, prejudicando a lipoproteína da membrana citoplasmática, levando a este extravasamento do citoplasma, bem como ao esvaziamento e murchamento das hifas, e presença de filamentos (ZAMBONELLI et al., 1996; CACCIONI; GUIZZARDI, 1994).



**FIGURA 5:** Inibição da germinação de conídios de *Penicillium digitatum* com óleos essenciais e fixos, empregando o método da epiderme destacada da cebola nas concentrações de (A) 1 mL.L<sup>-1</sup>; (B) 10 mL.L<sup>-1</sup> e (C) 100 mL.L<sup>-1</sup>.



**FIGURA 6:** Inibição da germinação de conídios de *Penicillium digitatum* com óleos essenciais e fixos, empregando o método da epiderme destacada da cebola nas concentrações de (D)1000 mL.L<sup>-1</sup>; (E)10.000 mL.L<sup>-1</sup> e (F)100.000 mL.L<sup>-1</sup>.



Todos os agentes de biocontrole nas concentrações e  $10^5$  a  $10^8$  UFC/mL de inibiram a germinação de conídios de *P. digitatum* acima de 50%. Porém, alguns agentes como *Pichia guilliermondii* (L29), *Pichia* spp. (L4-1) e *Saccharomyces cerevisiae* apresentaram inibição inferior (Tabela 3). Resultados similares foram obtidos por Franco e Bettioli (1999) onde estes avaliaram o efeito de produtos biológicos e alternativos no controle deste patógeno.

As leveduras apresentam características que as tornam promissoras para utilização como agentes de biocontrole, tais como: i) não produzem esporos alergênicos e não produzem toxinas como fazem os fungos filamentosos; ii) não sintetizam antibióticos como as bactérias (DROBY; CHALUTZ, 1997); iii) exigem nutrientes simples, podendo, inclusive, ser utilizados resíduos de indústrias como fonte de carbono (FREDLUND et al., 2002); e iv) não apresentam riscos ao consumidor (PASSOTH et al., 2006).

**TABELA 3** – Inibição da germinação de conídios de *Penicillium digitatum* por agentes de biocontrole, empregando o método da epiderme destacada da cebola.

Tratamento	% de inibição*			
	Concentrações			
	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>8</sup>
<i>Bacillus subtilis</i> (Serenade®)	59,5 b B	48,2b B	55,3bB	56,8 bB
<i>B. subtilis</i> e <i>Bacillus licheniformis</i> (Nemix®)	49,2 b B	67,4b B	48,5 b B	68,9 b B
<i>Pichia guilliermondii</i> (L29)	30,0 c C	31,2 cC	23,4cC	20,0 dC
<i>Sporobolomyces roseus</i> (L41)	100,0 a A	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA
<i>Rhodotorula mucilagenosa</i> (L17)	100,0 a A	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA
<i>Sporodiobolus pararoseus</i>	100,0 a A	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA
<i>Pichia</i> spp (L4-1)	16,0 d D	13,0 d D	18,3 dD	12,0 dD
<i>Derbaryomyces hansenii</i> (L62)	100,0 a A	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA
<i>Pichia membranifaciens</i> (L21)	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA
Bactéria isolada de laranja	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	29,3 cC	32,7 cC	28,5cC	39,4 cC
Thiabendazole (1500 µg/mL)	98,0aA	98,0aA	98,0aA	98,0aA

\*Média de nove discos de tecido da epiderme destacada da cebola, observação em dez campos por disco, após 21 horas de incubação em câmara úmida e escura a 25±2°C. \*Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si (P=0,05) \*Médias seguidas de letras maiúsculas iguais nas linhas não diferem entre si. \*Médias seguidas de letras minúsculas iguais nas colunas não diferem entre si.

#### 4.3 Controle de *Penicillium digitatum* em frutos de laranja com óleos fixos, óleos essenciais e agentes de biocontrole.

Os óleos essenciais e fixos nas concentrações 10.000 e 100.000 mL.L<sup>-1</sup> controlaram o bolor verde de forma semelhante ao fungicida Thiabendazole (Tabelas 4 a 9). Também não foram verificadas diferenças significativas entre as aplicações dos óleos 24 h antes, simultânea e 24 h depois da inoculação do patógeno (Tabelas 4 a 9). Esses resultados indicam que os óleos testados apresentam propriedades antimicrobianas capazes de controlar *Penicillium*

*digitatum* nos frutos de laranja, podendo ser uma alternativa ao uso de fungicidas sintéticos, como apregoado por Franco e Bettiol (2002), Torres et al. (2008), Bettiol et al. (2009) e Droby et al. (2010). Assim, esses produtos devem ser estudados em condições comerciais, pois são as condições em que necessitam realizar o controle. Porém, os óleos nas concentrações que apresentaram inibição tanto na incidência como na severidade apresentaram fitotoxicidade o que não ocorre com os agente sde biocontrole.

A discrepância desses resultados comparados com os obtidos por Plaza et al. (2004) pode se devido a metodologia de colheita das plantas estudadas, pois Morais et al. (2009) apresentam os efeitos das condições ambientais, nutricionais, bem como do momento de colheita do vegetal sobre a concentração dos componentes dos óleos essenciais.

Diversos trabalhos relatam à inibição do crescimento micelial de patogenos de pós-colheita por óleos essências O controle do bolor verde, tanto *in vivo*, como *in vitro*, por óleos essenciais de orégano (*Origanum vulgare*), Tomilho (*Thymus capitatus* e *T. serpyllum*) e cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata*) em laranja foi efetivo quando comparado ao fungicida padrão. Esses resultados demostram que o controle alternativo pode vir a ser uma importante ferramenta no controle do *P. digitatum* minimizando o uso abusivo dos fungicidas (MORAIS et al. 2009)

Resultados semelhantes com óleos essenciais foram obtidos por Bastos e Albuquerque (2004) quando estudaram, em testes *in vivo* e *in vitro*, o efeito do óleo de *Piper aduncum* (pimenta de macaco) no controle em pós-colheita de *Colletotrichum musae* em banana. O controle de 100% do crescimento micelial e da germinação do patógeno foi obtido na concentração de 100 µg/ml.

Plaza et al. (2004), de forma semelhante, verificaram que os óleos de *Origanum vulgare*, *Thymus captatus*, *Eugenia caryiohylatta* e *Cinnnamonum zeylanicum* apresentaram potencial em controle de *P. digitatum* e *P. italicum*. Entretanto, quando aplicados diretamente sobre os frutos de laranja até a concentração de 50.000 ppm não controlaram significativamente o bolor verde e o azul dos citros, diferindo do presente trabalho. Além disso, diversos apresentaram problemas de fitotoxicidade.

Para o experimento da eficiência dos agentes de biocontrole sobre o bolor verde em laranja, verificou-se que todos os agentes testados controlaram a incidência e a severidade da doença (Tabelas 10 e 11). Não foram observadas diferenças significativas entre as aplicações dos agentes de biocontrole nos diferentes períodos (24 h antes e depois e

simultaneamente à inoculação do patógeno). Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Lahlali et al. (2009) quando avaliaram a eficiência de *Pichia anomala* contra o bolor azul em maçãs com aplicações de pré- e pós-colheita. O objetivo principal do trabalho foi avaliar a habilidade do isolado de *Pichia anomala* (isolado K) em colonizar a superfície da maçã não permitindo a instalação do patógeno. Para isso, o isolado foi estudado em três cenários diferentes, 24 h horas antes e depois e simultaneamente a aplicação do patógeno, conforme o presente estudo. Como resultado obtido os autores verificaram que não houve diferenças significativas entre as três condições e que a concentração de  $1 \times 10^8$  UFC ml<sup>-1</sup> controlou *P. expansum* em frutos de maçã. Também a concentração do bioagente está de acordo com os resultados obtidos.

Droby et al (1997) pesquisaram o efeito da levedura *Pichia guilliermondii* isolado (US-7) no controle de *P. digitatum* de grapefruit. A incidência do bolor verde foi reduzida em de 43 a 52%. Existem diversos trabalhos utilizando leveduras *in vitro*, as quais inibem o desenvolvimento de fungos de pós-colheita. Fialho et al. (2004) observaram que a linhagem de levedura CR-1 apresentou inibição do crescimento micelial de *G. citricarpa in vitro*.

Espécies de leveduras epifíticas isoladas de abacaxi (*Cryptococcus* sp., *Cryptococcus albidus*, *P. guilliermondii*, *Rhodotorula aurantiaca* e *R. glutinis*) inibiram o crescimento micelial de *Ceratocystis paradoxa*, agente causal da podridão negra em pós-colheita de abacaxi em torno de 25 a 50% (REYS, 2004).

Ensaio *in vitro* com *Metschnikowia pulcheimrrima* mostraram redução do crescimento vegetativo de patógenos de maçãs em pós-colheita em torno de 31,3 e 18,8% para *Alternaria* sp. e *Botrytis cinerea*; e em torno de 20,8% para *P. expansum* e *Monilia* sp. (SPADARO et al., 2002). Além disso, no mercado foi lançado o produto Shemer, à base de *Metschnikowia fructicola*, para o controle de diversas doenças em pós-colheita (DROBY et al., 2009).

**Tabela 4.** Efeito de óleos essenciais e fixos na incidência e severidade do bolor verde causado por *Penicillium digitatum* em frutos de laranja 'Pêra' na dose de 1 mL.L<sup>-1</sup>

Tratamentos	% Incidência			% Severidade		
	Preventivo	Simultâneo	Curativo	Preventivo	Simultâneo	Curativo
<i>Cymbopogon citratus</i> (citronela)	83,5 b B	79,8 b B	100,0 b B	100,0 b B	100,0 b B	100,0 b B
<i>Pogostemon cablin</i> (Patchouli);	98,4 b B	87,4 b B	90,0 b B	100,0 b B	100,0 b B	100,0 b B
<i>Ocimum asilicum</i> L.(manjeriçã)	93,2 b B	84,0 b B	89,5 b B	100,0 b B	100,0 b B	100,0 b B
<i>Ocimum gratissimum</i> (Alfavaca Cravo)	87,0 b B	76,0 b B	98,5 b B	100,0 b B	89,6 b B	100,0 b B
<i>Mentha arvensis</i> (Menta)	98,0 b B	98,6 b B	89,5 b B	78,4 b B	100,0 b B	100,0 b B
<i>Ocimum basilicum</i> var. Maria bonita	89,7 b B	100,0 b B	99,0 b B	100,0 b B	100,0 b B	100,0 b B
<i>Romarinus officinalis</i> (Alecrim)	87,0 b B	100,0 b B	100,0 b B	89,6 b B	78,0 b B	87,4 b B
<i>Lippia sidoides</i> (Alecrim Pimenta)	98,2 b B	100,0 b B	90,0 b B	100,0 b B	100,0 b B	84,0 b B
<i>Azadirachta indica</i> (Nim)	89,5 b B	100,0 b B	100,0 b B	100,0 b B	98,0 b B	76,0 b B
<i>Allium sativum</i> (Alho)	87,4 b B	100,0 b B	100,0 b B	98,2 b B	100,0 b B	87,4 b B
<i>Copaifera langsdorffii</i> (Copaíba)	79,3 b B	100,0 b B	89,6 b B	89,5 b B	100,0 b B	84,0 b B
<i>Citrus aurantifolia</i> (Limão Tahiti)	98,0 b B	100,0 b B	100,0 b B	87,9 b B	100,0 b B	100,0 b B
<i>Cymbopogon citratus</i> (Capim limão)	89,6 b B	100,0 b B	98,6 b B	89,3 b B	100,0 b B	100,0 b B
<i>Eucalyptus spp</i> (Eucapto)	88,8 b B	100,0 b B	100,0 b B	98,0 b B	100,0 b B	100,0 b B
<i>Zingiber officinale</i> (Gengibre)	93,8 b B	100,0 b B	100,0 b B	100,0 b B	100,0 b B	100,0 b B
Testemunha inoculada	100,0 b B	100,0 b B	100,0 b B	100,0 b B	100,0 b B	100,0 b B
Thiabendazole (1500 µg/mL)	0,0 a A	0,0 a A	0,0 a A	0,0 a A	0,0 a A	0,0 a A

Dez frutos por tratamento;  $yS = (\text{diâmetro médio da lesão/altura média de todos os frutos do ensaio}) \times 100$ ; Leitura após 5 dias de incubação a 25 °C ± 5 e 85-90% UR. Para análise estatística, os dados foram transformados em arc sen da raiz quadrada de  $x/100$ . \* Médias seguidas de mesmas letras na coluna e linha não diferem entre si, ao nível de significância de 5%, pelo teste de Tukey.

**Tabela 5.** Efeito de óleos essenciais e fixos na incidência e severidade do bolor verde causado por *Penicillium digitatum* em frutos de laranja 'Pêra' na dose de 10 mL.L<sup>-1</sup>.

Tratamentos	% Incidência			% Severidade		
	Preventivo	Simultâneo	Curativo	Preventivo	Simultâneo	Curativo
<i>Cymbopogon citratus</i> (citronela)	78,0 b B	68,7 b B	98,4 b B	98,0 b B	100,0 b B	100,0 b B
<i>Pogostemon cablin</i> (Patchouli);	90,0 b B	89,0 b B	89,4 b B	89,7 b B	100,0 b B	100,0 b B
<i>Ocimum asilicum</i> L.(manjeriçã)	89,5 b B	76,5 b B	97,3 b B	87,0 b B	100,0 b B	88,7b B
<i>Ocimum gratissimum</i> (Alfavaca Cravo)	98,5 b B	89,7 b B	98,4 b B	98,2 b B	99,7 b B	100,0 b B
<i>Mentha arvensis</i> (Menta)	89,5 b B	88,4 b B	89,4 b B	89,5 b B	89,0 b B	100,0 b B
<i>Ocimum basilicum</i> var. Maria bonita	99,0 b B	89,4 b B	88,9 b B	98,0 b B	100,0 b B	78,9 b B
<i>Romarinus officinalis</i> (Alecrim)	87,5 b B	97,3 b B	100,0 b B	89,7 b B	79,5 b B	100,0 b B
<i>Lippia sidoides</i> (Alecrim Pimenta)	98,4 b B	89,4 b B	100,0 b B	100,0 b B	100,0 b B	100,0 b B
<i>Azadirachta indica</i> (Nim)	89,4 b B	78,4 b B	98,0 b B	100,0 b B	80,0 b B	98,5 b B
<i>Allium sativum</i> (Alho)	97,3 b B	100,0 b B	89,7 b B	89,5 b B	100,0 b B	89,5 b B
<i>Copaifera langsdorffii</i> (Copaíba)	89,4 b B	100,0 b B	87,0 b B	98,5 b B	90,0 b B	99,0 b B
<i>Citrus aurantifolia</i> (Limão Tahiti)	98,4 b B	98,0 b B	98,2 b B	89,5 b B	100,0 b B	87,5 b B
<i>Cymbopogon citratus</i> (Capim limão)	78,4 b B	89,7 b B	100,0 b B	100,0 b B	89,5 b B	98,4 b B
<i>Eucalyptus spp</i> (Eucapto)	89,3 b B	87,0 b B	100,0 b B	100,0 b B	98,7 b B	100,0 b B
<i>Zingiber officinale</i> (Gengibre)	78,4 b B	100,0 b B	100,0 b B	100,0 b B	100,0 b B	100,0 b B
Testemunha inoculada	100,0 b B	100,0 b B	100,0 b B	100,0 b B	100,0 b B	100,0 b B
Testemunha não inoculada	0,0 a A	0,0 a A	0,0 a A	0,0 a A	0,0 a A	0,0 a A
Thiabendazole (1500 µg/mL)	0,0 a A	0,0 a A	0,0 a A	0,0 a A	0,0 a A	0,0 a A

Dez frutos por tratamento;  $\gamma S = (\text{diâmetro médio da lesão/altura média de todos os frutos do ensaio}) \times 100$ ; Leitura após 5 dias de incubação a 25 °C±5 e 85-90% UR. Para análise estatística, os dados foram transformados em arc sen da raiz quadrada de  $x/100$ . \* Médias seguidas de mesmas letras na coluna e linha não diferem entre si, ao nível de significância de 5%, pelo teste de Tukey.

**Tabela 6.** Efeito de óleos essenciais e fixos na incidência e severidade do bolor verde causado por *Penicillium digitatum* em frutos de laranja 'Pêra' na dose de 100 mL.L<sup>-1</sup>.

Tratamentos	% Incidência			% Severidade		
	Preventivo	Simultâneo	Curativo	Preventivo	Simultâneo	Curativo
<i>Cymbopogon citratus</i> (citronela)	98,0 b B	98,0 b B	100,0 b B	100,0 b B	100,0 b B	89,5 b B
<i>Pogostemon cablin</i> (Patchouli);	89,7 b B	76,0 b B	100,0 b B	100,0 b B	100,0 b B	98,5 b B
<i>Ocimum asilicum</i> L.(manjeriçã)	87,0 b B	87,9 b B	100,0 b B	68,7 b B	100,0 b B	89,5 b B
<i>Ocimum gratissimum</i> (Alfavaca Cravo)	98,0 b B	86,5 b B	100,0 b B	89,0 b B	100,0 b B	99,0 b B
<i>Mentha arvensis</i> (Menta)	89,7 b B	89,5 b B	98,2 b B	76,5 b B	100,0 b B	87,5 b B
<i>Ocimum basilicum</i> var. Maria bonita	87,0 b B	78,9 b B	89,5 b B	89,7 b B	100,0 b B	89,5 b B
<i>Romarinus officinalis</i> (Alecrim)	100,0 b B	89,6 b B	98,0 b B	68,7 b B	100,0 b B	100,0 b B
<i>Lippia sidoides</i> (Alecrim Pimenta)	97,0 b B	76,5 b B	89,7 b B	89,0 b B	100,0 b B	100,0 b B
<i>Azadirachta indica</i> (Nim)	98,8 b B	100,0 b B	100,0 b B	100,0 b B	100,0 b B	100,0 b B
<i>Allium sativum</i> (Alho)	68,7 b B	100,0 b B	100,0 b B	100,0 b B	68,7 b B	100,0 b B
<i>Copaifera langsdorffii</i> (Copaíba)	89,0 b B	100,0 b B	89,5 b B	100,0 b B	89,0 b B	100,0 b B
<i>Citrus aurantifolia</i> (Limão Tahiti)	76,5 b B	100,0 b B	98,5 b B	89,6 b B	76,5 b B	100,0 b B
<i>Cymbopogon citratus</i> (Capim limão)	89,7 b B	100,0 b B	89,5 b B	76,5 b B	89,7 b B	100,0 b B
<i>Eucalyptus spp</i> (Eucapto)	89,6 b B	100,0 b B	100,0 b B	89,6 b B	68,7 b B	100,0 b B
<i>Zingiber officinale</i> (Gengibre)	100,0 b B	100,0 b B	100,0 b B	100,0 b B	89,0 b B	100,0 b B
Testemunha inoculada	100,0 b B	100,0 b B	100,0 b B	100,0 b B	100,0 b B	100,0 b B
Thiabendazole (1500 µg/mL)	0,0 a A	0,0 a A	0,0 a A	0,0 a A	0,0 a A	0,0 a A

Dez frutos por tratamento;  $S = (\text{diâmetro médio da lesão/altura média de todos os frutos do ensaio}) \times 100$ ; Leitura após 5 dias de incubação a 25 °C ± 5 e 85-90% UR. Para análise estatística, os dados foram transformados em arc sen da raiz quadrada de  $x/100$ . \* Médias seguidas de mesmas letras na coluna e linha não diferem entre si, ao nível de significância de 5%, pelo teste de Tukey.

**Tabela 7.** Efeito de óleos essenciais e fixos na incidência e severidade do bolor verde causado por *Penicillium digitatum* em frutos de laranja 'Pêra' na dose de 1000 mL.L<sup>-1</sup>.

Tratamentos	% Incidência			% Severidade		
	Preventivo	Conjunto	Curativo	Preventivo	Conjunto	Curativo
<i>Cymbopogon citratus</i> (citronela)	79,5 b B	100,0 b B	100,0 b B	100,0 b B	100,0 b B	100,0 b B
<i>Pogostemon cablin</i> (Patchouli);	100,0 b B	86,5 b B	86,5 b B	79,5 b B	100,0 b B	100,0 b B
<i>Ocimum asilicum</i> L.(manjeriçã)	80,0 b B	89,5 b B	89,5 b B	100,0 b B	100,0 b B	100,0 b B
<i>Ocimum gratissimum</i> (Alfavaca Cravo)	100,0 b B	78,9 b B	78,9 b B	80,0 b B	100,0 b B	89,7 b B
<i>Mentha arvensis</i> (Menta)	90,0 b B	89,6 b B	89,6 b B	100,0 b B	100,0 b B	87,0 b B
<i>Ocimum basilicum</i> var. Maria bonita	100,0 b B	86,5 b B	86,5 b B	90,0 b B	100,0 b B	100,0 b B
<i>Romarinus officinalis</i> (Alecrim)	89,5 b B	89,5 b B	89,5 b B	100,0 b B	98,0 b B	97,0 b B
<i>Lippia sidoides</i> (Alecrim Pimenta)	100,0 b B	100,0 b B	97,3 b B	89,5 b B	89,7 b B	98,8 b B
<i>Azadirachta indica</i> (Nim)	89,7 b B	89,5 b B	89,4 b B	98,7b B	100,0 b B	68,7 b B
<i>Allium sativum</i> (Alho)	87,0 b B	98,7b B	78,4 b B	98,0 b B	100,0 b B	89,0 b B
<i>Copaifera langsdorffii</i> (Copaíba)	100,0 b B	98,0 b B	100,0 b B	89,7 b B	89,5 b B	76,5 b B
<i>Citrus aurantifolia</i> (Limão Tahiti)	97,0 b B	89,7 b B	100,0 b B	87,0 b B	98,5 b B	89,7 b B
<i>Cymbopogon citratus</i> (Capim limão)	98,8 b B	87,0 b B	98,0 b B	98,2 b B	89,5 b B	89,6 b B
<i>Eucalyptus spp</i> (Eucapto)	89,7 b B	98,2 b B	100,0 b B	100,0 b B	100,0 b B	78,9 b B
<i>Zingiber officinale</i> (Gengibre)	100,0 b B	89,5 b B	100,0 b B	90,0 b B	78,9 b B	100,0 b B
Testemunha inoculada	100,0 b B	100,0 b B	100,0 b B	100,0 b B	100,0 b B	100,0 b B
Thiabendazole (1500 µg/mL)	0,0 a A	0,0 a A	0,0 a A	0,0 a A	0,0 a A	0,0 a A

Dez frutos por tratamento;  $yS = (\text{diâmetro médio da lesão/altura média de todos os frutos do ensaio}) \times 100$ ; Leitura após 5 dias de incubação a 25 °C ± 5 e 85-90% UR. Para análise estatística, os dados foram transformados em arc sen da raiz quadrada de  $x/100$ . \* Médias seguidas de mesmas letras na coluna e linha não diferem entre si, ao nível de significância de 5%, pelo teste de Tukey.



**Tabela 8.** Efeito de óleos essenciais e fixos na incidência e severidade do bolor verde causado por *Penicillium digitatum* em frutos de laranja 'Pêra' na dose de 10.000 mL.L<sup>-1</sup>.

Tratamentos	% Incidência			% Severidade		
	Preventivo	Simultâneo	Curativo	Preventivo	Simultâneo	Curativo
<i>Cymbopogon citratus</i> (citronela)	60 b A	39,0 b A	48,0 b A	17,1 b A	21,3 b A	24,6 b A
<i>Pogostemom cablin</i> (Patchouli)	0,0 a A	0,0 a A	0,0 a A	0,0 a A	0,0 a A	0,0 a A
<i>Ocimum asilicum</i> L.(manjeriçao)	40,0 b A	38,7 b A	34,8 b A	6,6 a A	5,7 a A	6,9 a A
<i>Ocimum gratissimum</i> (Alfavaca Cravo)	60,0 b A	49,0 b A	43,0 b A	16,1 b A	15,6 b A	18,9 b A
<i>Mentha arvensis</i> (Menta)	0,0 a A	0,0 a A	0,0 a A	0,0 a A	0,0 a A	0,0 a A
<i>Ocimum basilicum</i> var. Maria bonita	40,0 b A	37,0 b A	38,0 b A	6,8 a A	5,9 a A	7,2 a A
<i>Romarinus officinalis</i> (Alecrim)	10,0 a A	0,0 a A	0,0 a A	0,0 a A	0,0 a A	0,0 a A
<i>Lippia sidoides</i> (Alecrim Pimenta)	20,0 a A	0,0 a A	0,0 a A	0,0 a A	0,0 a A	0,0 a A
<i>Azadirachta indica</i> (Nim)	35,0 a A	7,8 a A	9,6 a A	2,8 a A	7,9 a A	8,6 a A
<i>Allium sativum</i> (Alho)	20,0 a A	9,8,0 a A	12,8 a A	2,8 a A	3,2 a A	4,6 a A
<i>Copaifera langsdorffii</i> (Copaíba)	30,0 b A	36,0 b A	43,4 b A	4,8 a A	5,4 a A	4,9 a A
<i>Citrus aurantifolia</i> (Limão Tahiti)	20,0 b A	19,0 b A	23,0 b A	2,0 a A	4,0 a A	5,9 a A
<i>Cymbopogon citratus</i> (Capim limão)	30,0 b A	21,7 b A	27,8 b A	5,9 a A	9,3 a A	5,7 a A
<i>Eucalyptus spp</i> (Eucapto)	0,0 a A	0,0 a A	0,0 a A	0,0 a A	0,0 a A	0,0 a A
<i>Zingiber officinale</i> (Gengibre)	0,0 a A	0,0 a A	0,0 a A	0,0 a A	0,0 a A	0,0 a A
Testemunha inoculada	100,0 c B	100,0 c B	100,0 c B	100,0 c B	100,0 c B	100,0 c B
Thiabendazole (1500 µg/mL)	0,0 a A	0,0 a A	0,0 a A	0,0 a A	0,0 a A	0,0 a A

Dez frutos por tratamento;  $\gamma S = (\text{diâmetro médio da lesão/altura média de todos os frutos do ensaio}) \times 100$ ; Leitura após 5 dias de incubação a 25 °C ± 5 e 85-90% UR. Para análise estatística, os dados foram transformados em arc sen da raiz quadrada de  $x/100$ . \* Médias seguidas de mesmas letras na coluna e linha não diferem entre si, ao nível de significância de 5%, pelo teste de Tukey.

**Tabela 9.** Efeito de óleos essenciais e fixos na incidência e severidade do bolor verde causado por *Penicillium digitatum* em frutos de laranja 'Pêra' na dose de 100.000 mL.L<sup>-1</sup>.

Tratamentos	% Incidência			% Severidade		
	Preventivo	Simultâneo	Curativo	Preventivo	Simultâneo	Curativo
<i>Cymbopogon citratus</i> (citronela)	50,0 b A	38,5 b A	27,4 b A	11,5 a A	12,6 a A	14,3 a A
<i>Pogostemom cablin</i> (Patchouli);	0,0 a A	0,0 a A	0,0 a A	0,0 a A	0,0 a A	0,0 a A
<i>Ocimum asilicum</i> L.(manjeriçãõ)	40,0 b A	38,4 b A	34,6 b A	7,4 a A	8,3 a A	9,5 a A
<i>Ocimum gratissimum</i> (Alfavaca Cravo)	50,0 b A	48,5 b A	33,5 b A	12,5 a A	13,9 a A	9,5 a A
<i>Mentha arvensis</i> (Menta)	0,0 a A	0,0 a A	0,0 a A	0,0 a A	0,0 a A	0,0 a A
<i>Ocimum basilicum</i> var. Maria bonita	40,0 b A	36,7 b A	36,5 b A	7,0 b A	8,3 a A	5,4 a A
<i>Romarinus officinalis</i> (Alecrim)	0,0 a A	0,0 a A	0,0 a A	0,0 a A	0,0 a A	0,0 a A
<i>Lippia sidoides</i> (Alecrim Pimenta)	0,0 a A	0,0 a A	0,0 a A	0,0 a A	0,0 a A	0,0 a A
<i>Azadirachta indica</i> (Nim)	10,0 b A	9,8 a A	9,4 b A	3,2 a A	4,3 a A	5,8 a A
<i>Allium sativum</i> (Alho)	10,0 b A	7,9 a A	9,5 b A	2,3 a A	1,6 a A	3,4 a A
<i>Copaifera langsdorffii</i> (Copaíba)	40,0 b A	38,4 b A	39,2 b A	4,3 a A	4,3 a A	5,8 a A
<i>Citrus aurantifolia</i> (Limão Tahiti)	20,0 b A	26,8 b A	17,9 b A	2,5 a A	2,8 a A	2,6 a A
<i>Cymbopogon citratus</i> (Capim limão)	30,0 b A	28,6 b A	27,5 b A	5,3 a A	4,3 a A	2,8 a A
<i>Eucalyptus spp</i> (Eucapto)	0,0 a A	0,0 a A	0,0 a A	0,0 a A	0,0 a A	0,0 a A
<i>Zingiber officinale</i> (Gengibre)	0,0 a A	0,0 a A	0,0 a A	0,0 a A	0,0 a A	0,0 a A
Testemunha inoculada	100,0 c B	100,0 c B	100,0 c B	100,0 c B	100,0 c B	100,0 c B
Thiabendazole (1500 µg/mL)	0,0 a A	0,0 a A	0,0 a A	0,0 a A	0,0 a A	0,0 a A

Dez frutos por tratamento;  $\gamma S = (\text{diâmetro médio da lesão/altura média de todos os frutos do ensaio}) \times 100$ ; Leitura após 5 dias de incubação a 25 °C±5 e 85-90% UR. Para análise estatística, os dados foram transformados em arc sen da raiz quadrada de  $x/100$ . \* Médias seguidas de mesmas letras na coluna e linha não diferem entre si, ao nível de significância de 5%, pelo teste de Tukey.

**Tabela 10.** Efeito dos agentes de biocontrole na concentração de  $10^8$  UFC/mL<sup>-1</sup> sobre a severidade do bolor verde causado por *Penicillium digitatum* em frutos de laranja 'Pêra'.

Tratamento	% Severidade		
	Preventivo	Simultânea	Curativo
<i>Bacillus subtilis</i> (Serenade®)	0,0 c	0,0 c	12,3 b
<i>B. subtilis</i> e <i>Bacillus licheniformis</i> (Nemix®),	0,0 c	24,2 b	0,0 c
<i>Pichia guilliermondii</i> (L29)	0,0 c	0,0 c	0,0 c
<i>Sporobolomyces roseus</i> (L41)	0,0 c	0,0 c	0,0 c
<i>Rhodotorula mucilagenosa</i> (L17)	0,0 c	0,0 c	0,0 c
<i>Sporodiobolus pararoseus</i>	12,0 b	0,0 c	20,7 b
<i>Pichia</i> sp (L4-1)	0,0 c	0,0 c	0,0 c
<i>Debaryomyces hansenii</i> (L62)	0,0 c	0,0 c	0,0 c
<i>Pichia membranifaciens</i> (L21)	0,0 c	0,0 c	0,0 c
Bactéria isolada de laranja	0,0 c	0,0 c	56,4 bd
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0,0 c	0,0 c	0,0c
Testemunha inoculada	100,0 a	100,0 a	100,0 a
Testemunha não inoculada	0,0 c	0,0 c	0,0 c
Thiabendazole (1500 µg/mL)	0,0 c	0,0 c	12,3 b

Para as análises estatísticas os dados foram transformados para arc sen raiz x/100. Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula na coluna, não diferem estatisticamente entre si (Tukey 1%). (%Severidade = Diâmetro médio das lesões/altura média dos frutos x 100).

**Tabela 11.** Efeito dos agentes de biocontrole na concentração de  $10^8$  UFC/mL<sup>-1</sup> sobre a incidência do bolor verde em frutos de laranja ‘Pêra’.

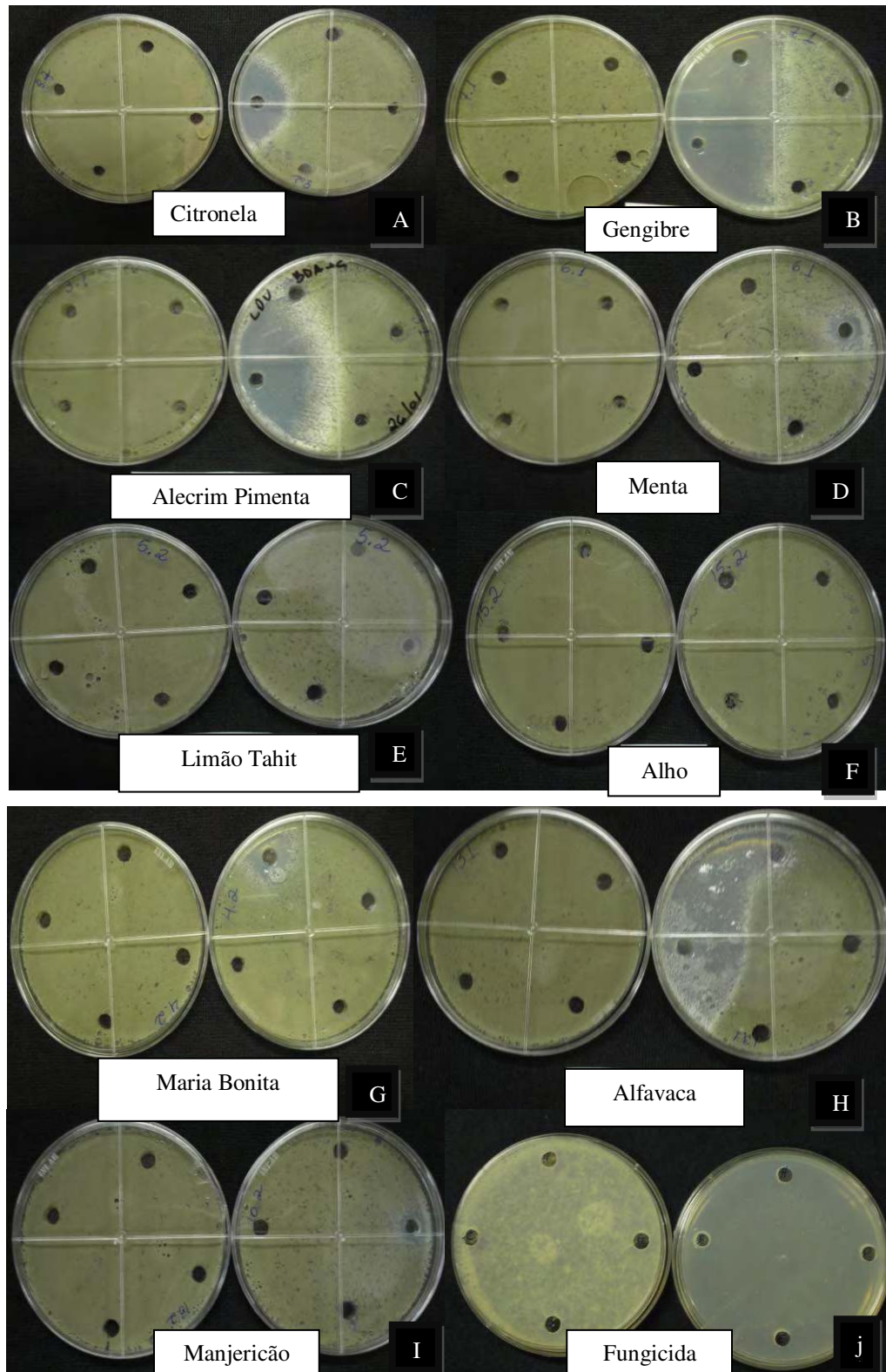
Tratamento	% Incidência		
	Preventivo	Simultânea	Curativo
<i>Bacillus subtilis</i> (Serenade®)	0,0 c	0,0 c	22,5 b
<i>B. subtilis</i> e <i>Bacillus licheniformis</i> (Nemix®),	0,0 c	0,0 c	0,0 c
<i>Pichia guilliermondii</i> (L29)	0,0 c	0,0 c	0,0 c
<i>Sporobolomyces roseus</i> (L41)	0,0 c	0,0 c	0,0 c
<i>Rhodotorula mucilagenosa</i> (L17)	0,0 c	0,0 c	0,0 c
<i>Sporodiobolus pararoseus</i>	0,0 c	0,0 c	0,0 c
<i>Pichhia</i> sp (L4-1)	0,0 c	0,0 c	32,4 b
<i>Debaryomyces hansenii</i> (L62)	0,0 c	0,0 c	0,0 c
<i>Pichia membranifaciens</i> (L21)	0,0 c	0,0 c	0,0 c
Bactéria isolada da laranja	0,0 c	0,0 c	0,0 c
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0,0 c	0,0 c	42,5 d
Testemunha inoculada	100,0 a	100,0 a	100,0 a
Testemunha não inoculada	0,0 c	0,0 c	0,0 c
Thiabendazole (1500 µg/mL)	0,0 c	0,0 c	0,0 c

#### 4.4. Efeito dos produtos alternativos na inibição do crescimento micelial de *Penicillium digitatum* in vitro

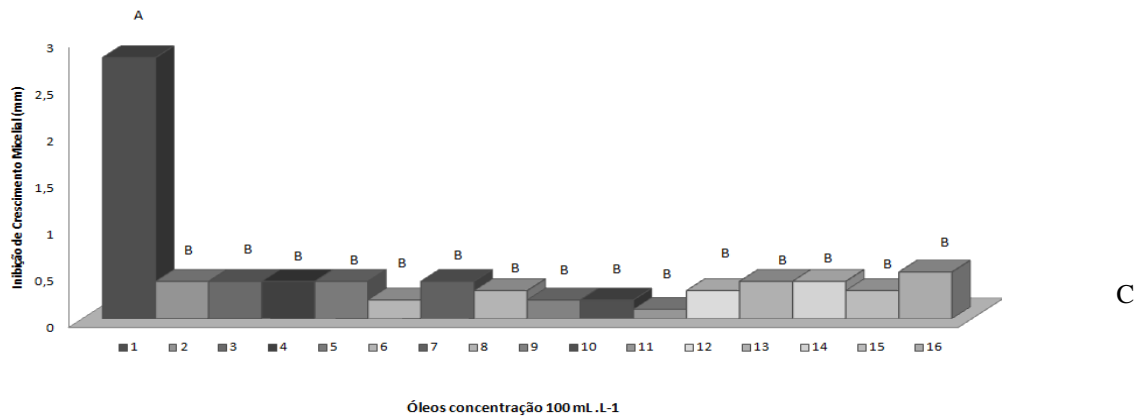
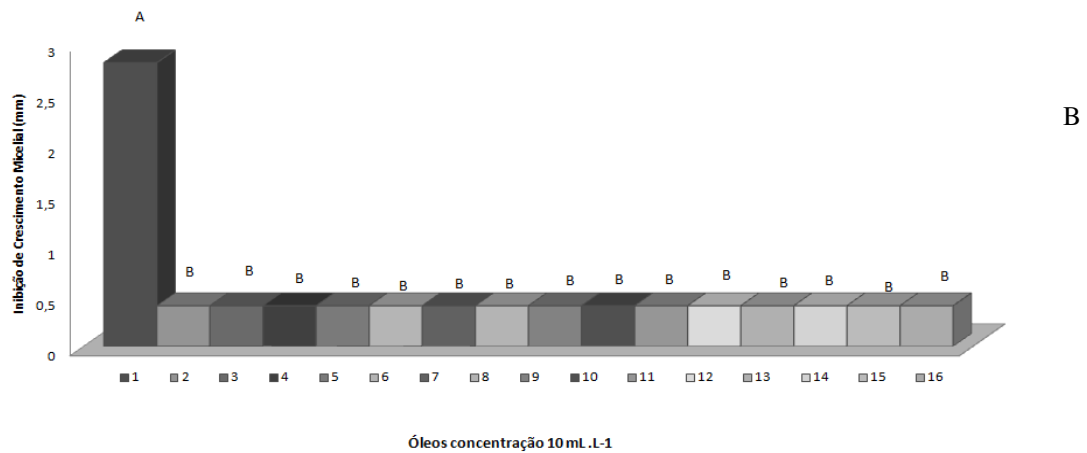
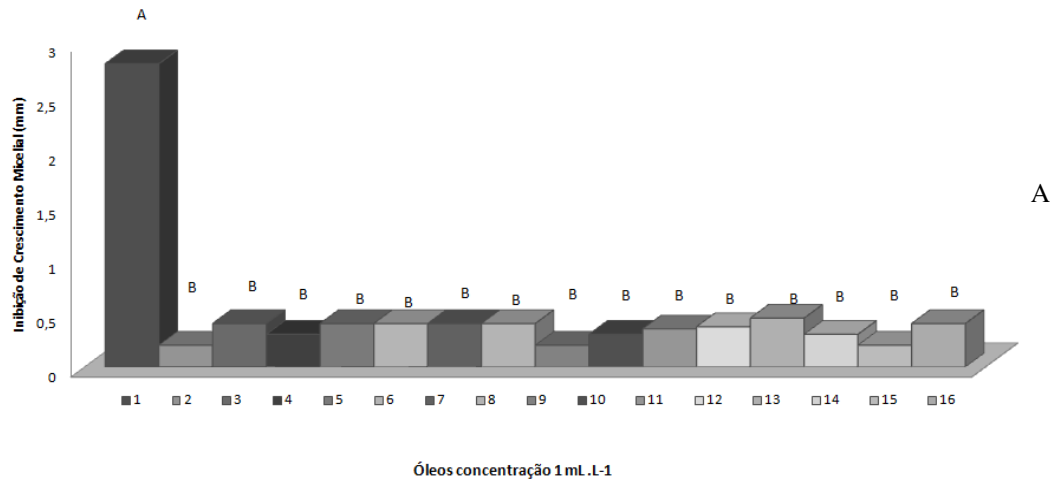
Os óleos essenciais e fixos nas concentrações de 10.000 ppm e 100.000 ppm inibiram o crescimento micelial de *Penicillium digitatum*, demonstrando que apresentam propriedades antimicrobianas capazes controlar esse patógeno (Figuras 7, 8 e 9) podendo ser uma alternativa para o controle de doenças de pós-colheita em citros. Nas concentrações inferiores não ocorreu crescimento micelial.

Shridar et al. (2003) estudaram a atividade antifúngica de treze óleos essenciais na concentração de 100 ppm foi testada sobre *Pyricularia oryzae*, *Dreschslera oryzae*, *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Colletotrichum capsici*, *Macrophomina phaseolina*, *Alternaria alternata*, *Phyllosticta* sp., *Pestalotia theae*, *Curvularia lunata*, *Fusarium oxysporum*, *Granaria uvicola*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Mycoesphaerella* sp., *Botrytis cinerea*, *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp., *Botryodiplodia theobromae*, *Cercospora nicotinicola* e *Phoma* sp. por meio da zona de inibição 72 horas após a incubação. O óleo essencial de *Cymbopogon martini* inibiu totalmente o crescimento micelial de *C. lindemuthianum*, *A. alternata*, *A. niger* e *A. flavus*. O óleo essencial de sementes de *Tachyspermum copticum* também inibiu em 100% o crescimento de *A. niger* e *A. flavus*. Esses resultados foram superiores aos obtidos no presente trabalho, pois apenas com 10.000 e 100.000 ppm foram observadas as inibições consistentes

Bastos e Albuquerque (2004) verificaram que óleo essencial de folhas de *Piper aduncum* inibiu 100% do crescimento micelial e da germinação de conídios de *Colletotrichum musae*, nas concentrações de 150 µg/mL e 100 µg/mL do óleo essencial de folhas de *P. aduncum*, respectivamente. Nos ensaios *in vivo*, todos os tratamentos reduziram a incidência e a severidade da doença, quando comparadas à testemunha. O resultado mais expressivo foi observado com o óleo essencial a 1%, o qual reduziu a incidência e a severidade em 100%, assim como o benomil. Os autores concluíram que o óleo essencial de folhas de *P. aduncum* apresenta potencial para uso no controle de *C. musae*, sendo necessária a realização de testes em condições comerciais (BASTOS; ALBUQUERQUE, 2004).

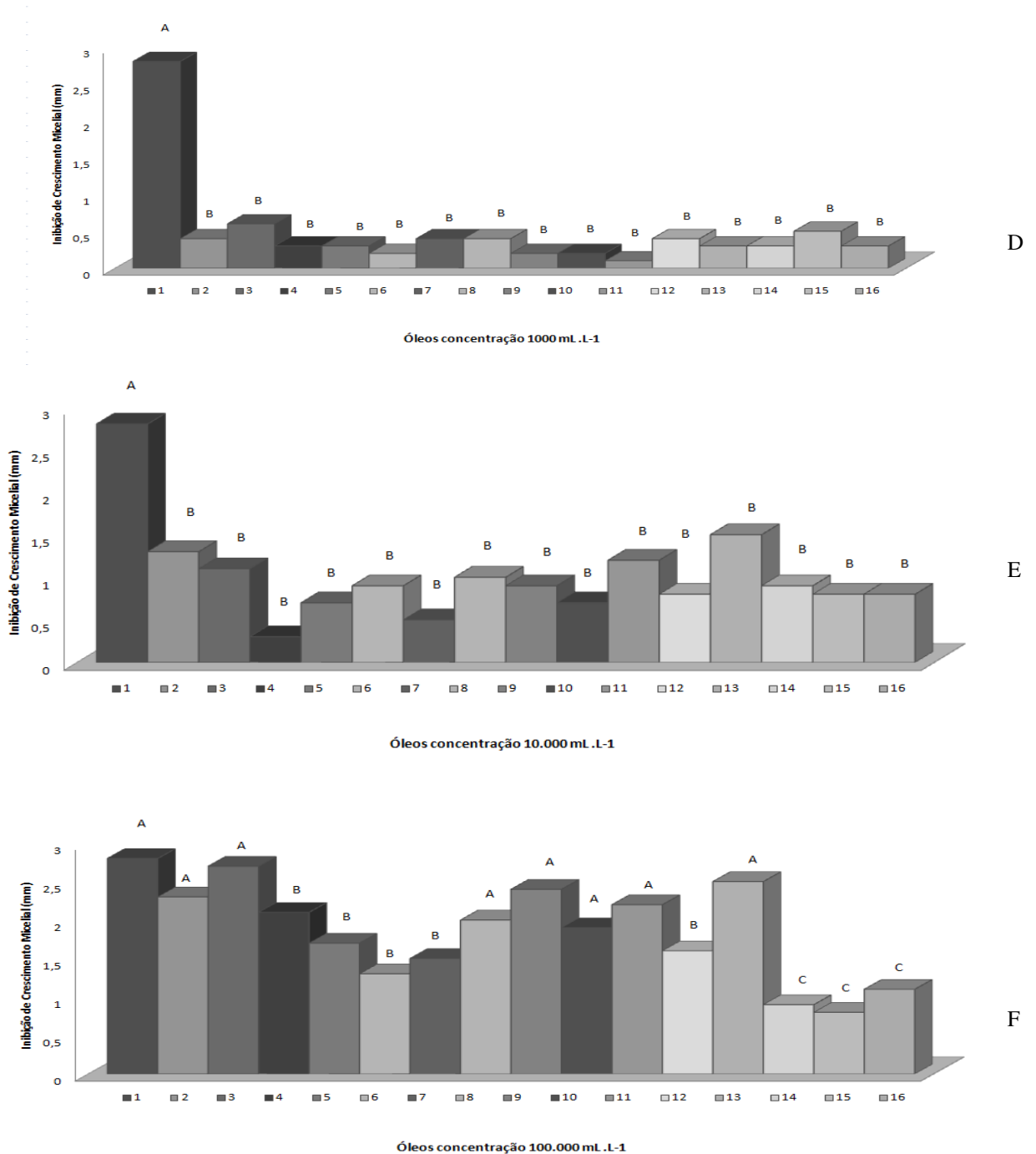


**Figura 7:** Inibição do crescimento micelial de *Penicillium digitatum* por óleos essenciais e fixos. (A) citronela; (B) Gengibre; (C) Alecrim Pimenta; (D) Menta; (E) Limão; (F) Alho; (G) Maria bonita; (H) Alfavaca; (I) Manjeriçao e (J) Thiabendazole.



(1) Thiabendazole (1500  $\mu\text{g/mL}$ ); (2) *Cymbopogon citratus* (citronela); (3) *Pogostemon cablin* (patchouli); (4) *Citrus aurantifolia* (limão thaiti); (5) *Ocimum asilicum* L. (manjeriçã); (6) *Ocimum gratissimum* (alfavaca cravo); (7) *Mentha arvensis* (menta); (8) *Eucalyptus spp* (eucalipto); (9) *Ocimum basilicum* var. Maria bonita; (10) *Romarinus officinalis* (alecrim); (11) *Lippia sidoides* (alecrim pimenta); (12) *Cymbopogon citratus* (capim limão); (13) *Zingiber officinale* (gingibre); (14) *Azadirachta indica* (nim); (15) *Allium sativum* (alho); (16) *Copaifera langsdorffii* (copaíba).

**Figura 8:** Inibição de Crescimento micelial de *Penicillium digitatum* por óleos fixos e essenciais, nas concentrações de (A) 1 mL.L<sup>-1</sup>; (B) 10 mL.L<sup>-1</sup> e (C) 100 mL.L<sup>-1</sup>.



(1) Thiabendazole (1500  $\mu\text{g/mL}$ ); (2) *Cymbopogon citratus* (citronela); (3) *Pogostemon cablin* (patchouli); (4) *Citrus aurantifolia* (limão thaiti); (5) *Ocimum asilicum* L. (manjeriçao); (6) *Ocimum gratissimum* (alfavaca cravo); (7) *Mentha arvensis* (menta); (8) *Eucalyptus spp* (eucalipto); (9) *Ocimum basilicum* var. Maria bonita; (10) *Romarinus officinalis* (alecrim); (11) *Lippia sidoides* (alecrim pimenta); (12) *Cymbopogon citratus* (capim limão); (13) *Zingiber officinale* (gingibre); (14) *Azadirachta indica* (nim); (15) *Allium sativum* (alho); (16) *Copaifera langsdorffii* (copaifaba).

**Figura 9:** Inibição de Crescimento micelial de *Penicillium digitatum* por óleos fixos e essenciais, nas concentrações (D) 1000 mL.L<sup>-1</sup>; (E) 10.000 mL.L<sup>-1</sup> e (F) 100.000 mL.L<sup>-1</sup>.



Benkeblia (2004) verificou a atividade antimicrobiana de diferentes concentrações (50, 100, 200, 300 e 500 mL/L) de óleo essencial extraído de três tipos de cebola (verde, amarela e vermelha) e de alho contra *Aspergillus niger*, *Penicillium cyclopium* e *Fusarium oxysporum*. Os óleos essenciais dessas plantas apresentaram acentuada atividade antimicrobiana, sendo o óleo essencial de alho com alta atividade inibitória em todas as concentrações testadas e a cebola verde com a mais baixa. *A. niger* foi menos inibido nas concentrações baixas (50 e 100 mL/L) de óleo essencial de cebola verde e amarela. No entanto, as altas concentrações exibiram acentuada inibição. Por outro lado, todas as concentrações de óleo essencial de cebola vermelha e alho apresentaram forte efeito inibitório contra *A. niger*. A sensibilidade de *P. cyclopium* aos óleos essenciais de cebola e alho foram próximas aos de *A. niger*, no entanto, o óleo essencial de cebola vermelha mostrou menor efeito inibitório contra *P. cyclopium* em baixas concentrações (50 e 100 mL/L). A análise estatística mostrou que 50 e 100 mL/L de concentração de óleo essencial de cebola verde, amarela e vermelha não foram significativamente diferentes. Por outro lado, as concentrações 200, 300 e 500 mL/L de cebola verde, amarela e vermelha e todas as concentrações de alho foram significativamente diferentes. *F. oxysporum* apresentou a menor sensibilidade ao óleo essencial de cebola verde, amarela e vermelha, exceto 300 e 500 mL/L de concentração de cebola vermelha que inibiu significativamente o seu desenvolvimento, sendo observada diferença significativa entre controle óleo essencial de alho contra *F. oxysporum*. No presente estudo o óleo de alho não apresentou alta inibição do crescimento de *P. digitatum* nem nas concentrações de 10.000 e 100.00 ppm. Portanto, pode-se considerar que a metodologia de extração do óleo de alho interfere nos resultados.

#### **4.5 Efeito de óleos essenciais e fixos e antagonistas no controle de *Guignardia citricarpa* em frutos de laranja ‘Pera’**

Os ensaios com os agentes de biocontrole, apesar das reduções no número de lesões de *G. citricarpa* em até 30% em relação à testemunha, essas diferenças não foram estatisticamente significativas (Tabela 12). Porém, mesmo com esses resultados negativos, esse fato não descarta esses agentes como potenciais para o controle biológico em pós-colheita,

visto que muitos deles têm mostrado ser eficientes no controle de várias doenças (FLORIANOWICZ, 2001; JANISIEWICZ; JEFFERS, 1997).

Fialho (2004) verificou que uma linhagem de levedura CR-1 apresentou inibição do crescimento micelial de *G. citricarpa* em testes *in vitro*. Toffano (2010) obteve controle de *G. citricarpa* em frutos cítricos com aplicação de volatéis produzidos por *S. cerevisiae*. Esses resultados demonstram a importância de mais estudos com controle biológico da doença. Entretanto, é importante considerar que o controle dessa doença deve ser realizado antes da colheita, pois é responsável por grandes perdas pré-colheita e também que apenas uma lesão causa rechasso do lote quando da exportação.

Como o controle *in vivo* não foi significativo (Tabela 12), os ensaios *in vitro* para explicar os mecanismos de ação não foram realizados, pois um fruto de laranja com sintoma não pode ser comercializado para outros países por se tratar de um fungo quarentenário A1.

Apesar de testados (dados não apresentados), nenhum dos óleos fixos (*Allium sativum*; *Copaifera langsdorffii*; *Eucalyptus* spp.; *Azadirachta indica*; *Coffea arabica*-cru; *Coffea arabica*-torrado) e essenciais (*Pogostemon cablin*, *Mentha arvensis*, *Cymbopogon citratus*, *Ocimum basilicum* var. Maria bonita, *Ocimum gratissimum*, *Pogostemon cablin*, *Romarinus officinalis*, *Salvia officinalis*, *Lippia sidoides*, *Zingiber officinale*, *Citrus aurantifolia*, *Piper aduncum* e *Ocimum basilicum*) controlaram a pinta preta nas concentrações testadas (1, 10, 100, 1000, 10.000 e 100.000 ppm). Além disso, nas maiores concentrações foram observados leve problemas de fitotoxicidade.

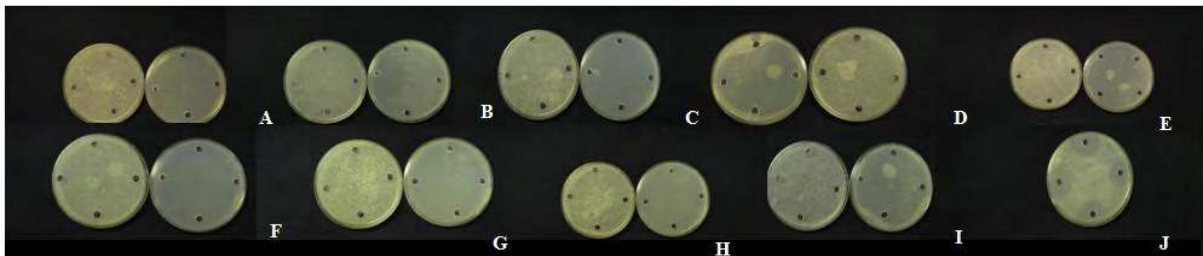
**Tabela 12.** Efeito dos agentes de biocontrole na evolução do número lesões de *Guignardia citricarpa* em laranja 'Pera' orgânica em condição de pós-colheita.

<b>Tratamento</b>	<b>% de aumento no número de lesões</b>
<i>Bacillus subtilis</i> (Serenade®)	84,8 a
<i>B. subtilis</i> e <i>Bacillus licheniformis</i> (Nemix®),	87,7 a
<i>Pichia guilliermondii</i> (L29)	93,8 a
<i>Sporobolomyces roseus</i> (L41)	87,9 a
<i>Rhodotorula mucilagenosa</i> (L17)	93,5 a
<i>Sporodiobolus pararoseus</i>	75,9 a
<i>Pichia</i> sp. (L4-1)	98,2 a
<i>Derbaryomyces hansenii</i> (L62)	98,4 a
<i>Pichia membranifaciens</i> (L21)	98,9 a
Bacteria isolada de laranja	96,7 a
<i>Saccharomyces cerevisae</i>	87,4 a
Testemunha inoculada	100,0 a

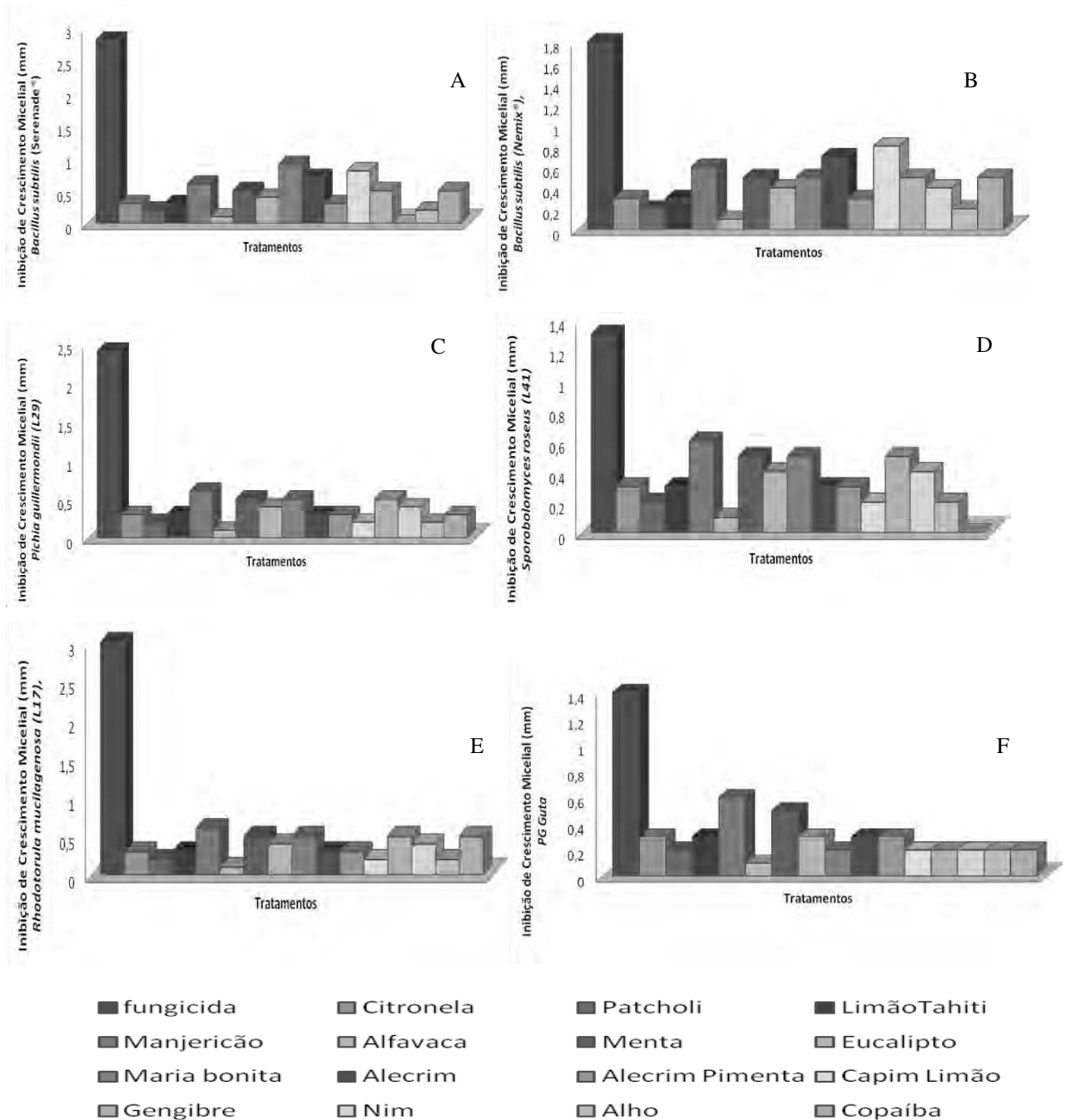
Para as análises os dados foram transformados para arc sen raiz x/100. Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula na coluna, não diferem estatisticamente entre (Tukey 5%). NS Não significativo.

#### 4.6 Efeito dos óleos fixos e essenciais sobre o desenvolvimento dos agentes de biocontrole

Os óleos essenciais e fixos testados não inibiram o crescimento dos antagonistas (Figuras 10, 11 e 12). Sendo este resultado promissor para a aplicação conjunta dos óleos com os agentes de biocontrole. A concentração testada neste experimento foi a de 100.000 ppm. Assim, é indispensável realizar estudos com a mistura de óleos e antagonistas que era objetivo desse estudo, porém não foi realizado. Estes resultados comprovam que os óleos podem ser utilizados cocomitantemente, com os agentes porém, estudos mais aprofundados devem ser realizados.

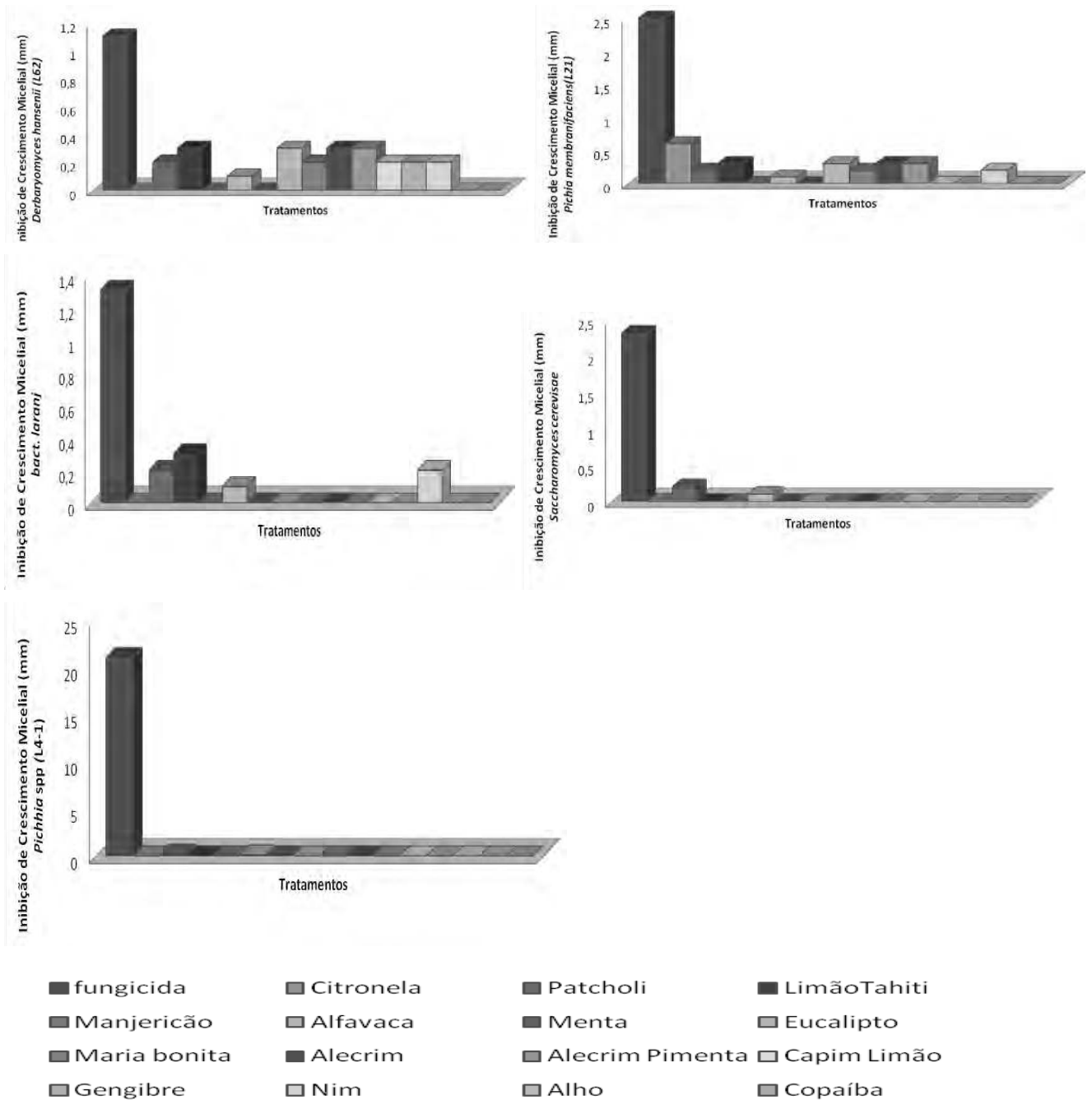


**Figura 10:** Antibiograma dos agentes de biocontrole frente aos óleos de (A) gengibre, (B) capim limão, (C) Maria bonita, (D) alfavaca, (E) citronela, (F) Alecrim, (G) Alho, (H) Manjerição, (I) Menta e (J) thiabendazole.



\* As legenda do gráfico assim como as colunas deveram ser observadas da direita para esquerda.

**Figura11:** Efeito de 100.000 ppm dos óleos fixos e essenciais sobre o desenvolvimento de *Bacillus subtilis* (Serenade®), *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* (Nemix®), *Pichia guillermondii* (L29), *Sporobolomyces roseus* (L41) *Rhodotorula mucilagenosa* (L17) e *Sporidiobolus pararoseus*.



**Figura12:** Efeito dos óleos fixos e essenciais sobre o desenvolvimento de *Derbaryomyces hansenii* (L62), *Pichia membranifaciens* (L21), bactéria isolada de laranja, *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia* sp (L4-1).

#### 4.7 Determinação de compostos presentes nos óleos fixos e essenciais por Cromatografia em Camada delgada e bioautografia

A composição química dos óleos essenciais é bastante complexa. São constituídos principalmente por terpenos, ésteres, éteres, álcoois, fenóis, aldeídos, óxidos, cetonas, ácidos orgânicos e diversos componentes detectados como elementos traços. Os cromatogramas dos óleos estão apresentados no Apendice.

Após a realização da técnica de CCD, realizou-se a bioautografia, onde foram utilizados *Pencillium digitatum* e os antagonistas *Bacillus subtilis* (Serenade®), *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* (Nemix®), *Pichia guilliermondii* (L29), *Sporobolomyces roseus* (L41), *Rhodotorula mucilagenosa* (L17), *Sporidiobolus pararoseus*, *Derbaryomyces hansenii* (L62), *Pichia membranifaciens* (L21), bactéria isolada de laranja, *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia* sp. (L4-1) para observar o halo de inibição sobre o composto visualizado na placa de cromatografia (esterilizada na luz ultravioleta por 1 h). Através de biomonitoramento com o do patógeno e dos antagonistas verificou-se que a fração mais apolar apresentou atividade visível. Os óleos aplicados na placa obtiveram os resultados apresentados na Tabela 9. Sendo assim, a bioautografia foi considerada um ensaio eficiente e sensível na determinação da atividade antimicrobiana, pois menos de 2,5 µg de substância utilizada foi suficiente para a formação do halo de inibição. Os dados apresentados não estabelecem a natureza dos compostos responsáveis pela ação antifúngica, porém estudos realizados com estes produtos demonstram que os mesmos são ricos em compostos fenólicos, substâncias que podem ser responsáveis pela ação verificada. A bioautografia confirmou neste trabalho a sua praticidade, visto ser uma técnica que pode ser utilizada tanto para extratos de plantas como para substâncias isoladas, principalmente por ser um ensaio simples, confiável, eficiente e sensível (PINTO et al., 2002).

Os cromatogramas dos óleos estão apresentados nos apêndices de 1 a 10.

**Tabela 13.** Resultados dos testes de bioautografia com os óleos fixos e essências e agentes biocontrole de que apresentaram atividade antifúngica.

Óleos	Microrganismo											
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
Citronela	+++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Patchouli	+++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Manjeriço	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Alfavaca	+++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Menta	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maria bonita	+++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Alecrim	+++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Alecrim pimenta	+++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nim	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Alho	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Copaíba	+++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Limão Tahiti	+++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Capim limão	+++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Eucalipto	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gengibre	+++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Thiabendazole (1500 µg/mL)	+++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(-) sem atividade; (+) baixa intensidade, (+++) alta atividade.

(A) *Penicillium digitatum*, (B) *Bacillus subtilis* (Serenade®), (C) *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* (Nemix®), (D) *Pichia guilliermondii* (L29), (E) *Sporobolomyces roseus* (L41), (F) *Rhodotorula mucilagenosa* (L17), (G) *Sporidiobolus pararoseus*, (H) *Derbaryomyces hansenii* (L62), (I) *Pichia membranifaciens* (L21), (J) bactéria isolada de laranja, (K) *Saccharomyces cerevisiae* e (L) *Pichia* sp. (L4-1).



## 4.9 Análise sensorial

Análise Sensorial é uma metodologia destinada a avaliar a aceitação de produtos no mercado, pesquisando os gostos e preferências de consumidores. Com base nos resultados é possível medir, avaliar e interpretar a percepção sensorial em relação ao produto analisado (CHAVES; SPROESSER, 1996). Os consumidores expressam suas opiniões em cabines individuais, onde recebem o produto a ser analisado, usando metodologia científica referendada internacionalmente, acompanhado de um formulário com perguntas pré-definidas para determinação dos resultados.

Empregam-se diferentes métodos de avaliação, visando determinar o perfil sensorial, a aceitação e preferências acerca dos produtos. Estes métodos podem ser orientados ao controle de qualidade, ao desenvolvimento de produtos e a estudos de consumidores (CHAVES; SPROESSER, 1996). Neste estudo, basicamente todos os consumidores entrevistados não gostaram do aroma das laranjas tratadas com óleos, mas não detectaram alterações nos frutos tratados com os antagonistas. Porém, ao ingerirem o suco da laranja tratadas com oleos não constataram sabor diferente, o mesmo ocorrendo com os antagonistas (Tabela 14). Esse aspecto é importante, pois demonstra que os agentes de biocontrole não interferem com as características avaliadas na análise sensorial.

**Tabela 14:** Resultados da análise sensorial realizada com os degustadores.

ATRIBUTOS	ÓLEOS FIXOS	OLEOS ESSENCIAIS	ANTAGONISTAS
APARÊNCIA			
Cor amarela	+++	++	++
Partículas	+++	++	-
Viscosidade	+++	+++	-
AROMA			
Laranja natural	+++	+++	-
Laranja Fermentada	-	-	-
SABOR			
Laranja natural	-	-	-
Laranja Fermentada	-	-	-
Gosto ácido	-	-	-
Gosto amargo	-	-	-

(-) Não constatado; (+) pouco constatado, (+++); muito constatado

\*Óleos fixos: *Allium sativum*; *Copaifera langsdorffii*; *Azadirachta indica*; *Coffea arabica*-cru; *Coffea arabica*-torrado) e essenciais, *Pogostemon cablin*; *Mentha arvensis*; *Cymbopogon citratus* (citronela); *Ocimum basilicum* var. Maria bonita; *Ocimum gratissimum* (Alfavaca Cravo); *Pogostemon cablin* (Patchouli); *Romarinus officinalis* (Alecrim); *Salvia officinalis* (Salvia de Marajó); *Lippia sidoides* (Alecrim Pimenta), *Zingiber officinale* (Gengibre); *Citrus aurantifolia*; *Piper aduncum* (Pimenta de macaco); *Ocimum basilicum* L. (manjeriçã). Agentes de controle biológico, *Bacillus subtilis* (Serenade®), *Bacillus subtilis* (Nemix®), *Pichia guilliermondii* (L29), *Sporobolomyces roseus* (L41), *Rhodotorula mucilagenosa* (L17), *Sporidiobolus pararoseus*, (7) *Pichia* sp. (L4-1), *Debaryomyces hansenii* (L62), *Pichia membranifaciens* (L21), bactéria isolada de laranja.

#### 4.9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A ocorrência de podridões pós-colheita em frutos de citros vem causando perdas significativas. Os frutos de citros são afetados por vários patógenos, dentre eles *Penicillium digitatum*, causador do bolor verde e *Guignardia citricarpa*, causador da mancha preta. Isto deprecia os frutos, provoca queda prematura dos mesmos e eleva o custo de produção (RAPUSSI-DA-SILVA, 2006).

O controle destes patógenos em frutos, principalmente os destinados à exportação, é feito com fungicidas sintéticos. Devido à preocupação com os riscos de contaminação ambiental, intoxicação humana e animal, ao surgimento de isolados fúngicos resistentes aos fungicidas, e à proibição da utilização de fungicidas em pós-colheita em alguns mercados, haverá maiores restrições ao uso de produtos sintéticos, não havendo substitutos viáveis até o momento (TOFFANO 2005; 2010). Assim, medidas alternativas, efetivas e economicamente viáveis de controle da mancha preta e do bolor verde devem ser disponibilizadas de imediato.

Todos os óleos essenciais *Pogostemon cablin*, *Mentha arvensis*, *Cymbopogon citratus*, *Ocimum basilicum* var. Maria bonita, *Romarinus officinalis*, *Lippia sidoides*, *Zingiber officinale*, *Citrus aurantifolia*, *Piper aduncum* e *Ocimum basilicum* e fixos de *Allium sativum*, *Copaifera langsdorffii*, *Eucalyptus* spp., *Azadirachta indica*, testados

neste trabalho controlaram o bolor verde (*P. digitatum*), sendo as concentrações eficientes de 10.000 ppm e 100.000 ppm. Essas concentrações podem ser consideradas altas por causarem problemas de fitotoxicidade e alterarem as características sensoriais dos frutos.

Mishra e Dubey (1994) verificaram que 3000 ppm do óleo essencial de *C. citratus* (capim limão), rico em citral, inibiu o crescimento de *A. flavus*. Verificaram ainda a inibição total do crescimento de *Penicillium*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Aspergillus* e *Botrytis* na concentração de 1500 ppm. Esses resultados diferem dos obtidos neste presente trabalho

Outra alternativa é a aplicação de agentes de controle biológico. Os antagonistas testados neste trabalho (*Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* (Nemix®), *Pichia guilliermondii* (L29), *Sporobolomyces roseus* (L41), *Rhodotorula mucilagenosa* (L17) e *Sporodiobolus pararoseus*, *Pichia* spp. (L4-1), *Debaryomyces hansenii* (L62), *Pichia membranifaciens* (L21) e uma bactéria isolada diretamente de frutos de laranja pêra) foram eficientes no controle *in vivo* e *in vitro* do bolor verde em laranja, porém os resultados não foram os mesmos para controle de *Guignardia citricarpa*.

As vantagens dos antagonistas em relação aos óleos observado no presente estudo foram: ausência de fitotoxicidade e não alteração das características organolépticas dos frutos, Associado a isso são microrganismos de fácil multiplicação e formulação e ainda não deixam resíduos. Portanto, sugere-se que os estudos sejam continuados com esse bioagentes de controle de *Penicillium digitatum*.

## 5 CONCLUSÕES

- Os óleos essenciais de *Pogostemon cablin*, *Mentha arvensis*, *Cymbopogon citratus*, *Ocimum basilicum* var. Maria bonita, *Rosmarinus officinalis*, *Lippia sidoides*, *Zingiber officinale*, *Citrus aurantifolia*, *Piper aduncum* e *Ocimum basilicum* e os óleos fixos de *Allium sativum*, *Copaifera langsdorffi*, *Eucalyptus* spp.e *Azadirachta indica* nas concentrações de 10.000 ppm e 100.000 ppm foram eficientes em contralar o bolor verde da laranja, causado por *P. digitatum* e na inibição da germinação e do crescimento micelial do fungo.
- Os agentes de biocontrole *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* (Nemix®), *Pichia guilliermondii* (L29), *Sporobolomyces roseus* (L41), *Rhodotorula mucilagenosa* (L17) e *Sporodiobolus pararoseus*. *Pichia* spp. (L4-1), *Derbaryomyces hansenii* (L62), *Pichia membranifaciens* (L21) e uma bactéria isolada diretamente de frutos de laranja pêra. na concentração de  $10^8$  controlaram eficientemente o bolor verde da laranja, causado por *P. digitatum* e inibiram a germinação e o crescimento micelial do patógeno.
- Não foram verificadas diferenças significativas entre as aplicações dos óleos e dos agentes de biocontrole preventiva, curativa ou simultâneamente à inoculação do patógeno.

- Todos os óleos essenciais testados não interferiram no crescimento dos agentes de biocontrole testados.
- Os óleos alteraram as características analisadas nos estudos de análise sensorial. Por outro lado, não foram detectados problemas com os agentes de biocontrole.
- Os óleos causaram fitotoxicidade nas concentrações que foram eficientes no controle de *P. digitatum*.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, C. L.; COSTA F. P.; KUPPER, K. C. Controle alternativo de *Penicillium* spp. em frutos cítricos na fase pós-colheita. **Biológico**, São Paulo, v. 68, n. 1/2, p. 29-86, jan./dez. 2006.

ALVES, M. L. N. **Avaliação do potencial de leveduras dos géneros *Pseudozyma* e *Rhodospordium* no controlo biológico pós-colheita de bolores**. 2007. 121 p. Dissertação (Mestrado em Controlo da Qualidade e Toxicologia dos Alimentos)-Universidade de Lisboa, Lisboa, 2007.

ARRAS, G. et al. Biocontrol by yeasts of blue mould of citrus fruits and the mode of action of an isolate of *Pichia guilliermondii*. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, Kent, v. 73, n. 3, p. 413-418, 1998.

ARRAS, G.; DEMONTIS, S.; SUSSARELLU, L. Characterization of yeasts (*Pichia guilliermondii* and *Rhodotorula glutinis*) antagonistic to *Penicillium digitatum*. **Annali di Microbiologia ed Enzimologia**, Milano, v. 46, n. 2, p. 285- 298, 1996.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CITRICULTORES. Disponível em: <<http://www.associtrus.com.br>>. Acesso em: 12 out. 2010.

BALDASSARI, R. B.; REIS, R. F. dos; GOES A. de. Relato de mancha preta do citros em pomares do Estado de Minas Gerais. In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 27., 2004, Campinas. **Anais...** Campinas: Instituto Agrônômico, 2004. p. 126.

BARKAI-GOLAN, R. **Postharvest diseases of fruits and vegetables**: development and control. Amsterdam: Elsevier, 2001. 418 p.

BASTOS, C. N.; ALBUQUERQUE, S. B. Efeito do óleo de *Piper aduncum* no controle em pós-colheita de *Colletotricum musae* em banana. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 29, n. 5, p. 555-557, 2004.

BAUDOIN, A. B. A. M.; ECKERT, J. W. Factors influencing the susceptibility of lemons to infection by *Geotrichum candidum*. **Phytopathology**, Saint Paul. n. 72, p. 1592-1597, 1982.

BENATO, E. A. Indução de resistência no controle de doenças pós-colheita: frutas e hortaliças. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE INDUÇÃO DE RESISTENCIA EM PLANTAS CONTRA FITOPATÓGENOS, 1., 2002, São Paulo. **Palestras...** Piracicaba: USP, ESALQ, 2002. p. 29-31.

BENATO, E. A.; CIA, P.; SOUZA, N. L. Manejo de doenças de frutas pós-colheita. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 9, p. 403-440, 2001.

BENKEBLIA, N. Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and (*Allium sativum*). **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie**, Mosraganem, v. 3, p. 263-8, 2004.

BETTIOL, W.; GHINI R. Controle biológico. In: KIMATI, H. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. 3. ed. São Paulo: Agrônômica Ceres, 1995. v. 1, p. 717-728.

BETTIOL, W.; GHINI, R. Proteção de plantas em sistemas agrícolas alternativos. In: CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W. (Eds.). **Métodos alternativos de controle fitossanitário**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2003. p. 79-97.



BEZERRA, J. L. Bioprotetores comerciais para o controle de doenças de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo fundo, v. 17, p. 111-147, 2009.

BROWN, G. E. Factors affecting postharvest development of *Colletotrichum gloeosporioides* in citrus fruits. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 65, p. 404-409, 1975.

BUS, V. G.; BONGERS, A. J.; RISSE, L. A. Occurrence of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* resistant to benomyl, thiabendazole, and imazalil on citrus fruit from different geographic origins. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 75, p. 1098-1100, 1991.

CACCIONI, D. R. L.; GUIZZARDI, M. Inhibition of germination and growth of fruit and vegetable postharvest pathogenic fungi by essential oil components. **Journal of Essential Oil Research**, Camberra, v. 6, p. 173-9, 1994.

CARTA, C.; ARRAS, G. Azione inibitrice in vitro di olii essenziali nei confronti di alcuni patogeni di piante ornamentali. **La Defesa Delle Piante**, Udine, v. 10, p. 195-202, 1987.

CHAVES, J. B. P.; SPROESSER, R. L. **Práticas de laboratório de análise sensorial de alimentos e bebidas**. Viçosa: UFV, Imprensa Universitária, 1996. 81 p.

CITROS: laranja. **Agrianual 2009**: anuário da agricultura brasileira, São Paulo, p. 267-282, 2009.

COELHO, A. R.; HOFFMANN, F. L.; HIROOKA, E. Y. Biocontrole de doenças pós-colheita de frutas por leveduras: perspectivas de aplicação e segurança alimentar. **Semina: ciência agrária**, Londrina, v. 24, p. 347-368, 2003.

CREEMMES, P. Chemical control of parasitic storage diseases on Apple and pears. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 258, p. 639-643, 1989.

DAFERERA, D. J.; ZIOGAS, B. N.; POLISSIOU, M. G. The effectiveness of planta essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. **Crop Protection**, London, v. 22, p. 39-44, 2003.

DHINGRA, O. D. Patologia pós-colheita. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 11, n. 122, p. 46-50, 1985.

DOOL, V. H.; KRATZ, D. J. A generalization of the retention index system including liner temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography**, Oxford, v. 11, p. 463-467, 1963.

DROBY, S. et al. Induction of resistance to *Penicillium digitatum* in grapefruit by the yeast biocontrol agent *Candida oleophila*. **Biological Control**, Dordrecht, v. 92, p. 393-399, 2002.

DROBY, S. et al. Twenty years of postharvest biocontrol research: is it time for a new paradigm? **Postharvest biology and Technology**, Amsterdam, v. 52, p. 137-145, 2009.

DROBY, S.; CHALUTZ, E. Mode of action of biocontrol agents of postharvest diseases. In: WILSON, C. L.; WISNIEWSKI, M. E. (Eds.). **Biological control of postharvest diseases: theory and practice**. Boca Raton: CRC Press, 1997. p. 63-75.

ECKERT J. W. Impact of fungicide resistance on citrus fruit decay control. In: GREEN, M. B., LE BARON, H. M.; MOBERG, W. K. (Eds.). **Managing resistance to agrochemicals**. Riverside: ACSS, 1990. p. 286-302. (Series, 421).

ECKERT, J. W.; EAKS, I. L. Postharvest disorders and diseases of citrus fruits. In: REUTER, W.; CALAVAN, E. C.; CARMAN, G. E. (Eds.). **The citrus industry**. Berkeley: University of California Press, 1989. v. 5, p. 179-260.

FEICHTENBERGER, E. et al. Doenças dos citros. In: KIMATI, H. et al. (Eds.). **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2, p. 239- 271.

FEICHTENBERGER, E.; MULLER, G. W.; GUIRADO, N. Doenças dos citros. In: KIMATI, H. et al. (Eds.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. v. 2, p. 261-296.

FERRACINI, V. L. **Óleos essenciais de Baccharis e sua interação com insetos polinizadores**. 1995. 205 p. Tese (Doutorado em Química Orgânica)-Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1995.

FIALHO, M. B. **Efeito in vitro de *Saccharomyces cerevisiae* sobre *Guignardia citricarpa*, agente causal da pinta-preta dos citros**. 2004. 60 p. Dissertação (Mestrado Microbiologia Agrícola)-Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

FISCHER, I. H.; LOURENCO, S. A.; AMORIM, L. Doenças pós-colheita em citros e caracterização da população fungica ambiental no mercado atacadista de São Paulo. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, DF, v. 33, n. 3, p. 219-226, 2008.

FLORIANOWICZ, T. Antifungal activity of some microorganisms against *Penicillium expansum*. **European Food Research Technology**, Berlin, v. 212, n. 3, p. 282-286, 2001.

FRANCO, D. A. S.; BETTIOL, W. Efeito de produtos alternativos para o controle do bolor verde (*Penicillium digitatum*) em pós-colheita de citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, p. 569-572, 2002.

FRANCO, D. A. S.; BETTIOL, W. Eficiência do método do flavedo para avaliar a germinação de conídios de *Penicillium digitatum*, agente causal do bolor verde dos frutos cítricos. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 26, n. 2, p. 265-268, 2000.

FREDLUND, M. D.; FREDLUND, D. G.; WILSON, G. W. An equation to represent grain-size distribution. **Canadian Geotechnical Journal**, Ottawa, v. 37, p. 817-827, 2000.

FUNDECITRUS. **Manual de pinta preta**. Araraquara, 2000. 7 p. Manual.

GOES, A. de. Controle da mancha-preta dos frutos cítricos. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 19, p. 305-320, 1998.

GOES, A. Efeito da combinação de fungicidas sistêmicos e protetores no controle da mancha preta dos frutos cítricos causados por *Guignardia citricarpa*. **Summa Phytopatologica**, Botucatu, v. 28, p. 9-13, 2002.

GOGOI, R.; BARUAH, P.; NATH, S. C. Antifungal activity of the essential oil of *Litsea cubeba* Pers. **Journal of Essential Oil Research**, Wheaton, v. 9, p. 213-215, 1997.

HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants: the links between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry**, Elmsford, v. 12, p. 3864-3874, 1991.

JANISIEWICZ, W. J.; JEFFERS, S. N. Efficacy of commercial formulation of two biofungicides for control of blue mold and gray mold of apples in cold storage. **Crop Protection**, London, v. 16, p. 629-633, 1997.

JANISIEWICZ, W. J.; KORSTEN, L. Biological control of postharvest diseases of fruits. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, n. 40, p. 411-441, 2002.

JONES, R. W.; PRUSKY, D. Expression of a antifungal peptide *Saccharomyces*: a new approach for biological control of the postharvest disease caused by *Colletotrichum coccodes*, **Biological Control**, Dordrecht, v. 92, n. 1, p. 33-37, 2002.

KOTZÉ, J. M. Black spot. In: WHITESIDE, J. O.; GARNSEY, S. M.; TIMMER, L. W. (Eds.). **Compendium of citrus disease**. Saint Paul: APS Press, 1989. p. 10-12.

KOTZÉ, J. M. Epidemiology and control of Citrus Black Spot in South Africa. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 65, p. 945-950, 1981.

KOTZÉ, J. M. History and epidemiology of citrus black Spot in South Africa. **Proceedings of the International Society of Citriculture**, Berkley, v. 2, p. 1296-1299, 1996.

KRETZSCHMAR, A. A. Controle biológico de patógenos que ocorrem em pós-colheita. In: BETTIOL, W. **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA, CNPDA, 1991. p. 53-69.

LAHLALI, R.; HAÏSSAM JIJAKLI, M. Enhancement of the biocontrol agent *Candida oleophila* (strain O) survival and control efficiency under extreme conditions of water activity and relative humidity. **Biological Control**, Dordrecht, v. 51, n. 3, p. 403-408, 2009.

LARANJEIRA, F. F. et al. Controle das doenças causadas por fungos e bactérias em citros. In: ZAMBOLIM, L. et al. (Eds.). **Controle de doenças de plantas fruteiras**. Viçosa: UFV, Imprensa Universitária, 2002. p. 141-246.

MACHADO, M. A. C. F.; BETTIOL, W. Potencial para o biocontrole de *Botrytis cinerea* por leveduras em sistema integrado de cultivo de lírio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 45, n. 6, p. 539-545, jun. 2010.

MARI, M. et al. Susceptibility of apricot and peach fruit to *Monilinia laxa* during phonological stages. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 30, p. 105- 109, 2003.

MARI, M.; GUIZZARDI, M. The postharvest phase: emerging technologies for the control of fungal diseases. **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v. 26, p. 59-66, 1998.

McONIE, K. C. The latent occurrence in citrus and other hosts of a *Guignardia* easily confused with *G. citricarpa*, the citrus black spot pathogen. **Phytopathology**, Lancaster, v. 54, p. 40-43, 1967.

MISHRA, A. K.; DUBEY, N. K. Evaluation of some essential oils for their toxicity against fungi causing deterioration of stored food commodities. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 60, p. 1101-1105, 1994.

MORAIS, L. A. S.; GONÇALVES, G. G.; BETTIOL, W. Óleos essenciais no controle de doenças de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 17, p. 257-304, 2009.

MORANDI, M. A. B. Avanços no controle biológico de doenças em pós-colheita. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE DE DOENÇAS DE PLANTAS, 2., 2002, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2002. p. 71-78.

MOURA, R. D. **Utilização de leveduras e óleos essenciais no controle de podridões de melão em pós-colheita**. 2004. 34 p. Monografia (Graduação em Agronomia)-Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

NICOLI, A.; ZAMBOLIM, L. et al. Comparação da eficiência entre produtos alternativos e fungicidas no controle de bolor verde em laranja. **Revista Tropica: ciências agrárias e biológicas**, Chapadinha, v. 3, n. 2, p. 12, 2009.

NISPEROS, M. O.; BALDWIN, E. A. Edible coatings for whole and minimally processed fruits and vegetables. **Food Australia**, North Sydney, v. 48, n. 1, p. 27-31, 1996.

NORTHOVER, J.; BIGGS, A. R. Susceptibility of immature and mature sweet and sour cherries to *Monilinia fructicola*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 74, p. 280-284, 1990.

NUNES, C. et al. Improved control of postharvest decay of pears by combination of *Candida sake* (CPA-1) and ammonium molybdate. **Biological Control**, Dordrecht, v. 92, n. 3, p. 281-287, 2002.

OLIVEIRA, S. M. A. et al. **Patologia pós-colheita: frutas, olerícolas e ornamentais tropicais**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2006. 855 p.

PALOU, L. et al. Micoflora em centrales citrícolas de Tarragona. **Revista Investigación Agraria: production y protección vegetal**, Madrid, v. 16, p. 447-462, 2001.

PASSOTH, V. et al. Biotechnology, physiology and genetics of the yeast *Pichia anomala*. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 6, n. 1, p. 3-13, 2006.

PEREIRA, M. E. C. et al. **Procedimentos pós-colheita na produção integrada de citros**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. 40 p.

PIMENTA, R. S. et al. Biological control of *Penicillium italicum*, *P. digitatum* and *P. expansum* by the predacious yeast *Saccharomycopsis schoenii* on oranges. **Brazilian Journal Microbiology**, São Paulo, v. 39, n. 1, p. 85-90, 2008.

PINTO, A. C. et al. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, p. 45-61, 2002.

PITAROKILI, D. et al. Composition and antifungal activity of the essential oil of *Salvia pomifera* subsp. *calicyna* growing wild in Greece. **Journal Essential Oil Research**, Wheaton, v. 11, p. 655-659, 1999.

PLAZA, P. et al. Evaluation of the potencial of comercial post-harvest applications of essential oils to control citrus decay. **Journal Horticultural Science and Biotechnology**, Ashford, v. 79, p. 935-940, 2004.

QUING, B.; SINGH, V. T.; SINGH, D. B. Postharvest biological control of *Rhizopus* rot nectarine fruits by *Pichia membranefaciens*. **Plant Disease**, New York, v. 84, n. 11, p. 1212-1216, 2000.

RAPPUSSI-DA-SILVA, M. C. C. **Efeito da quitosana e da radiação UV-C no controle de *Guignardia citricarpa* em laranja pós-colheita**. 2006. 82 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitopatologia)-Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

REIS, R. F.; TIMMER, L. W.; GÓES, A. Effect of temperature, leaf wetness, and rainfall on the production of *Guignardia citricarpa* ascospores and on black spot severity on sweet orange. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 31, p. 29-34, 2006.

REYS, M. E. Q.; ROHRBACH, H. D.; PAUL, R. E. Microbial antagonist control y and postharvest Black rot of pineapple fruits. **Postharvest Biology Technology**, Amsterdam, v. 33, p. 193-203, 2004.

RITZINGER, C. H. S. P. et al. **Mamão fitossanidade**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2000. 91 p. (Frutas do Brasil, 11).

SAITO, M. D. L.; SCRAMIN, S. **Plantas aromáticas e seu uso na agricultura**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. 48 p. (Documentos, 20).

SHARMA, R. L.; KAUL, J. L. Susceptibility of apples to brown rot in relation to quantitative characters. **Indian Phytopathology**, New Delhi, v. 43, p. 113-115, 1988.

SILVEIRA, N. S. S. et al. Hongos fitopatogenos asociados a frutos comercializados en Recife, Pernambuco (Brasil). **Boletín Micológico**, Valparaiso, v. 16, p. 41-47, 2005.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 1999. 821 p.

SMILANICK, J. L. et al. Control of citrus green mold by carbonate and bicarbonate salts and the influence of comercial postharvest practices on their efficacy. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 83, p. 139-145, 1999.

SRIDHAR, S. R. et al. Antifungal activity of some essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 51, p. 7596-7599, 2003.



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 citros. In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 28., 2005, São Paulo. In: **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 31, p. 16-16, 2005. Suplemento.

TOFFANO, L.; PASCHOLATI, S. F. Efeito dos extratos do Albedo de *Citrus sinensis* e Flavedo de *Citrus aurantifolia* no crescimento micelial, germinação e formação de apressório de *Guignardia citricarpa*, *Penicillium digitatum* e *Colletotrichum gloeosporioides*. In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 28., 2005, São Paulo. In: **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 31, p. 13-13, 2005. Suplemento.

TORRES, R. et al. Alternativas al uso de fungicidas de síntesis para el control de podredumbres en cítricos. In: NASCIMENTO, L. M.; NEGRI, J. D.; MATTOS JUNIOR, D. **Tópicos em qualidade e pós-colheita de frutas**. Campinas: IAC, 2008. p. 189-199.

WHITESIDE, J. O.; GARNSEY, S. M.; TIMMER, L. W. **Compendium of citrus diseases**. 2nd ed. Saint Paul: APS Press, 1993. 87p.

WILSON, C. L.; PUSEY, P. L. et al. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetable: alternatives to synthetic fungicides. **Crop Protection**, Oxford, v. 10, p. 172-177, 1991.

WILSON, C. L.; PUSEY, P. L. Potential for biological control of postharvest plant disease. **Plant Disease**, New York, v. 69, p. 375-378. 1985.

WILSON, C. L.; WISNIEWSKI, M. E. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: an emerging technology. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 27, p. 425-44, 1989.

ZAMBONELLI, A. et al. Effects of essential oils on phytopathogenic fungi in vitro. **Journal of Phytopathology**, Berlim, v. 144, p. 491-494, 1996.

ZANARDO, N. M. T.; PASCHOLATI, S. F.; FIALHO, M. B. Resistência de plântulas de pepineiro a *Colletotrichum lagenarium* induzida por frações de extrato de *Saccharomyces cerevisiae*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 44, p. 1499-1503, 2009.

ZANI, F. et al. Studies on the genotoxic properties of essential oils with *Bacillus subtilis* rec-assay and *Salmonella microsoma* reversion assay. **Planta Medica**, New York, v. 57, p. 237-241, 1991.

## ANEXOS

**Anexo 01.** Composição química de *Ocimum basilicum* var. Maria bonita

<b>Picos</b>	<b>Índice de KOVATS</b>	<b>% da Substância</b>	<b>Sustância Provável</b>
1	930	0,84	Alfa pineno (939)
2	947	0,40	Alfa-fencheno (951)
3	969	0,98	Sabineno (976)
4	975	1,32	Beta-pineno (980)
5	985	1,48	Mirceno (991)
6	1021	0,32	Para-cimeno (1022)
7	1026	2,63	Limoneno (1031)
8	1029	12,06	1,8 cineol (1033)
9	1054	0,50	Gama -Terpineno (1062)
10	1099	63,59	Linalol (1098)
11	1144	1,06	Canfora (1143)
12	1192	0,66	Alfa terpineol (1189)
13	1195	1,25	Metil chavicol (1195)
14	1234	0,31	Ni
15	1247	5,84	Trans-sabineno hidrato (1253)
16	1374	1,71	Acetato de nerila (1365)
17	1385	0,37	Ni
18	1429	2,84	Alfa bergamoteno (1436)
19	1479	0,60	Gama –muruleno (1477)
20	1508	0,77	Guaieno (1500)
21	1603	0,48	Alfa cadinol (1640)

**Anexo 02.** Composição química do óleo essencial de Gengibre (*Zingiber officinalis*)

<b>Picos</b>	<b>Índice de KOVATS</b>	<b>% da Substância</b>	<b>Sustância Provável</b>
1	930,0	traços	Alfa-tujeno (931)
2	946,	9,9%	Canfeno (991)
3	979	traços	Deceno (991)
4	985	2,9%	Mirceno (991)
5	1025	2,3%	Limoneno (1031)
6	1027	8,9%	Beta-felandreno (1033)
7	1029	7,1%	1,8 cineol (1033)
8	1033	-	Ni
9	1192	1,4%	Alfa-terpineol (1189)
10	1234	14,4%	Neral (1240)
11	1263	25,3%	Geranial (1270)
12	1289	-	Ni
13	1476	2,5%	Curcumeno (1483)
14	1490	7,8%	Alfa – zingibereno (1495)
15	1500	3,1%	Alfa farneseno (1508)
16	1503	1,3%	Beta bisaboleno (1509)
17	1519	3,0%	Beta sesquifelandreno (1524)
18	1556	1,0%	Nerolidol (1564)

**Anexo 03 -** Composição química do óleo essencial de Manjeriço (*Ocimum basilicum*).

<b>Picos</b>	<b>Índice de KOVATS</b>	<b>% da Substância</b>	<b>Sustância Provável</b>
1	933,333	1,31	alfa-pineno (939)
2	950,106	1,19	Alfa-fencheno (951)
3	972,669	1,25	Sabineno (976)
4	978,990	2,13	Beta-Pineno (980)
5	989,089	1,30	Mirceno (991)
6	1029,128	2,44	Limoneno (1031)
7	1032,631	26,08	1,8-Cineol (1033)
8	1089,860	2,12	Fenchona (1087)
9	1101,145	40,04	Linalol (1098)
10	1147,515	13,56	Cânfora (1143)
11	1195,741	1,37	Alfa-terpineol (1189)
12	1418,319	2,24	Trans-cariofileno (1418)
13	1432,492	1,65	Trans alfa bergamoteno (1436)
14	1479,667	3,33	Germacreno D.

**Anexo 04.** Composição química do óleo essencial de Citronela (*Cymbopogon citratus*).

<b>Picos</b>	<b>Índice de KOVATS</b>	<b>% da Substância</b>	<b>Substância provável</b>
1	1029,392	5,20	Limoneno (1031) hidrato de Trans-sabineno (1097)
2	1101,099	0,73	
3	1152,462	57,88	Citronelal (1153)
4	1227,178	3,88	Citronelol (1228)
5	1250,607	7,34	Geraniol (1255)
6	1267,814	0,85	Geranial (1270)
7	1350,335	5,19	Citronelil Acetato (1254)
8	1378,718	4,24	Geranil Acetato (1383)
9	1389,214	4,06	Beta-Elemeno (1391)
10	1474,039	0,64	Gama-Muuroleno (1477)
11	1480,199	3,56	Germacreno D(1480)
12	1497,568	1,03	Ni
13	1512,394	1,02	Gamma Candineno(1513)
14	1517,584	3,52	Delta Candineno (1524)
15	1993,374	0,86	Ni

**Anexo 05.** Composição química do óleo essencial de Alecrim Pimenta (*Lippia sidoides*)

<b>Picos</b>	<b>Índice de KOVATS</b>	<b>% da Substância</b>	<b>Sustância Provável</b>
1	923,376	2,79	Alfa-tujeno (931)
2	931,144	1,20	Alfa-pineno (939)
3	976,342	0,64	Sabineno (976)
4	986,582	8,57	Beta-Pineno (980)
5	1008,085	0,36	Alfa-felandreno (1005)
6	1015,486	3,08	Alfa-terpineno (1018)
7	1022,728	20,65	Para-Cimeno (1026)
8	1026,969	1,39	Limoneno (1031)
9	1030,445	1,14	1,8-Cineol (1033)
10	1032,262	0,37	Cis-ocimeno (1040)
11	1042,613	0,62	Trans-ocimeno (1050)
12	1055,175	8,65	Gama-Terpineno (1062)
13	1088,412	0,55	Ni
14	1098,314	0,68	Linalol (1098)
15	1139,524	0,89	Ni
16	1167,003	0,66	Ni
17	1178,452	1,36	terpin-4-ol (1177)
18	1226,826	1,98	Metil éter timol (1235)
19	1287,911	20,49	Para-Cimen-7-ol (1287)
20	1342,117	0,39	Ni
21	1372,398	0,87	Alfa-copaeno (1376)
22	1415,933	18,46	Gama-cariofileno (1404)
23	1429,898	0,34	Thujopseno (1429)
24	1434,298	1,08	Beta-gurjeno (1432)
25	1451,482	0,80	Alfa-humuleno (1454)
26	1486,637	0,87	Beta-Selineno (1485)
27	1491,223	0,40	Ni
28	1504,341	0,43	Beta-bisaboleno (1509)

**Anexo 06.** Composição química do óleo essencial de *Ocimum gratissimum* (Alfavaca Cravo).

<b>Picos</b>	<b>Índice de KOVATS</b>	<b>% da Substância</b>	<b>Sustância Provável</b>
1	931,142	1,31	alfa-pineno (939)
2	970,212	1,04	Sabineno (976)
3	976,475	2,59	Beta-Pineno (980)
4	986,582	1,05	Mirceno (991)
5	1027,132	0,64	Limoneno (1031)
6	1030,526	28,57	1,8-Cineol (1033)
7	1032,184	4,25	Cis-ocimeno (1040)
8	1098,316	1,08	Linalol (1098)
9	1193,245	0,70	Alfa-terpineol (1189)
10	1348,437	31,70	Eugenol (1356)
11	1415,616	7,87	Trans - cariofilleno (1418)
12	1449,115	0,77	Alfa-humuleno (1454)
13	1469,052	0,69	Ni
14	1475,649	3,13	Germacreno D(1480)
15	1479,772	0,61	ni
16	1484,016	9,52	Beta-Selineno (1485)
17	1491,147	3,53	Alfa-Selineno (1494)
18	1514,286	0,94	Delta Candinene(1524)

**Anexo 07.** Composição química do óleo essencial de *Pogostemom cablin* (Patchouli)

<b>Picos</b>	<b>Índice de KOVATS</b>	<b>% da Substância</b>	<b>Sustância Provável</b>
1	1093,45	0,18	Ni
2	1032,710	0,20	Ni
3	1383,832	2,11	Beta-Patchoulene (1380)
4	1388,879	1,16	Beta-elemeno (1390)
5	1413,826	0,74	Alfa – cedreno (1409)
6	1418,597	4,77	trans-cariofileno (1418)
7	1434,877	18,80	Alfa-Guaieno (1439)
8	1447,777	7,94	Gama-Patchouleno (1441)
9	1454,493	0,78	Alfa-Humuleno (1454)
10	1459,958	5,75	Alfa-Patchouleno (1456)
11	1462,946	1,75	Seicheleno (1460)
12	1466,651	1,69	Allo – aromadendreno (1460)
13	1474,456	0,48	Gama-Gurjuneno (1473)
14	1487,911	0,27	Beta-Selineno (1485)
15	1494,627	3,76	Alfa-Selineno(1494)
16	1497,638	0,81	Germacreno – A (1503)
17	1500,703	23,71	Alfa-Bulneseno (1505)
18	1504,827	0,34	Ni
19	1561,533	0,30	Germacreno B (1556)
20	1568,955	0,29	Ni
21	1580,136	0,30	Ni
22	1656,384	0,49	Ni
23	1669,583	23,37	Patchoulol(1659)



**Anexo 08** - Composição química do óleo essencial de Capim Limão (*Cymbopogon citratus*)

<b>Picos</b>	<b>Índice de KOVATS</b>	<b>% da Substância</b>	<b>Sustância Provável</b>
1	905,155	0,57	Ni
2	944,774	0,33	Ni
3	985,134	1,10	Octanona (986)
4	989,654	23,34	Mirceno (991)
5	1020,200	0,33	Ni
6	1029,207	0,57	1,8-Cineol (1033)
7	1034,659	0,70	Cis-Beta ocimeno (1031)
8	1180,627	1,26	Mentol (1188)
9	1238,650	27,54	Neral (1240)
10	1268,432	43,49	Geranial (1270)
11	1293,602	0,38	Hidróxido de citronelal (1285)
12	1947,347	0,39	Cembreno A (1942)

**Anexo 09.** Composição química do óleo essencial de limão Tahiti (*C. latifolia* Tanaka).

<b>Picos</b>	<b>Índice de KOVATS</b>	<b>% da Substância</b>	<b>Sustância Provável</b>
1	931	2,14	A-tujeno
2	939	0,54	A-pineno
3	976	1,60	Sabineno
4	980	8,68	$\beta$ -pineno
5	991	2,58	Mirceno
6	1018	1,04	$\alpha$ -terpineno
7	1031	44,93	Limoneno
8	1033	6,0	1,8-cineol
9	1062	9,79	$\gamma$ -terpineno
10	1088	0,72	Terpinoleno
11	1098	1,11	Linalol
12	1177	1,39	terpine-4-ol
13	1189	2,18	$\alpha$ -terpineol
14	1198	0,64	metil-chavicol
15	1240	5,33	Neral
16	1270	7,90	Geranial
17	1365	0,96	acetato de neril
18	-	0,78	não identificado
19	1436	0,58	trans- $\alpha$ -bergamoteno
20	1509	1,10	$\beta$ -bisaboleno