

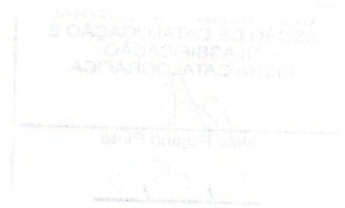
LUANA APARECIDA CASTILHO MARO

**CONTROLE DO BOLOR VERDE EM CITROS COM PRODUTOS
ALTERNATIVOS AOS AGROQUÍMICOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL

2010



Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

M354c
2010

Maro, Luana Aparecida Castilho, 1984-
Controle do bolor verde em citros com produtos
alternativos aos agroquímicos / Luana Aparecida Castilho
Maro. – Viçosa, MG, 2010.
xi, 68f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Inclui apêndice.

Orientador: Luiz Carlos Chamhum Salomão

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Cítricos - Doenças e danos. 2. Cítricos - Fisiologia pós-
colheita. 3. Cítricos - Conservação. 4. Mofo (Botânica).
5. Óleos vegetais. 6. Biomassa vegetal. I. Universidade
Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 634.30494

LUANA APARECIDA CASTILHO MARO

**CONTROLE DO BOLOR VERDE EM CITROS COM PRODUTOS
ALTERNATIVOS AOS AGROQUÍMICOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 24 de fevereiro de 2010.

Prof. Paulo Roberto Cecon
(Coorientador)

Prof. Olinto Liparini Pereira
(Coorientador)

Prof. José Geraldo Barbosa

Prof. Sérgio Yoshimitsu Motoike

Prof. Luiz Carlos Chamhum Salomão
(Orientador)

Ao meu saudoso avô Castilho.
Aos meus amados pais Anar e Elaine.
Ao querido Márcio.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, a quem pertence minha vida, minha alegria de hoje e as incertezas do amanhã, que me deu coragem para a luta e perseverança para vencer.

Ao meu avô Castilho, pela presença constante desde meus primeiros dias de vida, que sempre fez minhas vontades, me cercou de carinho e amor, dele restaram comigo a saudade, o exemplo e seu sorriso.

Aos meus pais, que, mesmo distantes, estiveram sempre comigo, me apoiando e torcendo pelos meus sonhos. A vocês, queridos pais, a quem muito amo, ofereço essa vitória! Gratidão que palavras dificilmente vão traduzir.

Aos meus irmãos Anar Walter, Kenner, Karlla e Karinna, que nos momentos importantes entenderam minha ausência, compreenderam por muitas vezes não sorrirmos e chorarmos juntos, pelos tantos momentos furtados ao seu convívio.

Aos meus sobrinhos Laryssa, Matheus, Lorena, Thiago, Flávia, Geovanna, Nathália, Victor, Antônio e Maria Fernanda, que coloreminha vida e a tornam plena.

Ao Márcio, por levar luz à minha vida e sentido às coisas que faço. Obrigada, pelo amor, boas risadas e amizade.

A minha avó Zulmira, que sempre ocupará um lugar especial no meu coração.

À Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Departamento de Fitotecnia, pela oportunidade de realização do Curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Professor Luiz Carlos Chamhum Salomão, por sempre me incentivar a fazer o melhor possível, pelo exemplo profissional e pelos infindáveis ensinamentos, manifesto meu reconhecimento e estima. Obrigada, especialmente pela disponibilidade de orientação.

Ao Professor Dalmo Lopes de Siqueira, por me receber sempre de bom humor, pela atenção e pelas sugestões no decorrer do Curso.

Ao Professor Olinto Liparini Pereira, que aceitou dividir conosco a experiência de trabalhar com esse patossistema e contribuiu de maneira indispensável para que este trabalho fosse possível.

Ao Professor Paulo Roberto Cecon, pelos ensinamentos estatísticos e disponibilidade em me atender todas as vezes em que foi necessário.

Aos Professores José Geraldo Barbosa e Sérgio Yoshimitsu Motoike, pela disposição em participar da banca examinadora e pelas sugestões e correções que muito enriqueceram este trabalho.

Aos colegas que se tornaram amigos: Aline Rocha, Cícero Lucena, Danieele, Dierlei e sua esposa Daiane, José Osmar, Lorena, Márcio Gama, Moisés Zucoloto, Telma, Ricardo Negreiros e Cláudia Negreiros, Rafaela Roma e Robson. Obrigada pelos bons momentos que tornaram essa caminhada mais leve e repleta de alegria.

Aos amigos Arthur Dias, Angélica e Carol Mata, Deniete, Luana Cristina, Luisa Scudeller e Renata Domingos, agradeço pela amizade, apoio e momentos inesquecíveis. Viçosa jamais seria a mesma sem vocês!

À Família Abrantes, de Tocantins-MG, pela doação das tangerinas para realização de parte deste trabalho.

Aos funcionários do Setor de Fruticultura, Carla, Cenira, Rosângela, Sabino e Sobreira, pelo bom convívio.

BIOGRAFIA

LUANA APARECIDA CASTILHO MARO, filha de Anar Dharmakataka Maro e Elaine Elena Castilho Maro, nasceu na cidade de Sete Lagoas, Minas Gerais, em 08 de outubro de 1984.

Em fevereiro de 2003, ingressou na Universidade Estadual de Montes Claros (Unimontes), graduando-se em Engenharia Agrônômica em dezembro de 2007.

Em março de 2008, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, em nível de Mestrado, da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG, submetendo-se à defesa de tese em 24 de fevereiro de 2010.

CONTEÚDO

	Página
RESUMO	viii
ABSTRACT	x
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	7
CAPÍTULO 1	11
CONTROLE DO BOLOR VERDE EM TANGERINAS ‘PONCÃ’ COM PRODUTOS ALTERNATIVOS AOS AGROQUÍMICOS	11
RESUMO	11
1. INTRODUÇÃO.....	13
2. MATERIAL E MÉTODOS	15
2.1. Avaliações	17
2.1.1. Incidência.....	17
2.1.2. Severidade.....	17
2.1.3 Período de incubação e período latente.....	17
2.1.4. Perda de massa de matéria fresca.....	18
2.1.5. Produção de CO ₂	18
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
3.1. Incidência.....	20

3.2. Severidade	29
3.3. Período de incubação e período latente.....	31
3.4. Perda de massa de matéria fresca.....	34
3.5. Produção de CO ₂	34
4. CONCLUSÕES	36
CAPÍTULO 2	37
CONTROLE DO BOLOR VERDE EM LARANJAS ‘VALÊNCIA’ COM PRODUTOS ALTERNATIVOS AOS AGROQUÍMICOS	37
RESUMO	37
1. INTRODUÇÃO.....	39
2. MATERIAL E MÉTODOS	41
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
3.1. Incidência.....	44
3.2. Severidade	48
3.3. Período de incubação e período latente.....	53
3.4. Perda de massa de matéria fresca.....	54
3.5. Produção de CO ₂	57
4. CONCLUSÕES	59
CONCLUSÕES GERAIS	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
APÊNDICE	66

RESUMO

MARO, Luana Aparecida Castilho, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2010. **Controle do bolor verde em citros com produtos alternativos aos agroquímicos.** Orientador: Luiz Carlos Chamhum Salomão. Co-orientadores: Olinto Liparini Pereira, Paulo Roberto Cecon e Dalmo Lopes de Siqueira.

O bolor verde, causado pelo fungo *Penicillium digitatum*, é uma das principais doenças na pós-colheita dos frutos cítricos. Neste trabalho foram testados os efeitos de produtos alternativos aos agroquímicos no controle do bolor verde em tangerinas ‘Poncã’ e em laranjas ‘Valência’. Frutos fisiologicamente maduros foram feridos superficialmente na região equatorial com um tubo de 9 mm de diâmetro preenchido por agulhas e inoculados com uma suspensão de conídios de *P. digitatum* na concentração de 1×10^6 conídios/mL. Após a secagem ao ar, foram pulverizados até o molhamento completo com água destilada (testemunha), água destilada + 8 mL/L de tween 20, imazalil (200 mL de Magnate® 500 EC/100 L de água), thiabendazole (103 mL de Tecto® SC/100 L de água), tiofanato metílico (70 g de Cercobin® 700 WP/100 L de água), quitosana 10 mL/L de água ou óleos essenciais de alho 10 mL/L de água, cravo-da-índia 5 mL/L de água, nim 10 mL/L de água, pimenta longa 5 mL/L de água e biomassa cítrica 10 mL/L de água. Os óleos essenciais e a quitosana foram acrescentados de 8 mL/L de tween 20. Em seguida, os frutos foram acondicionados em grupos de três em bandejas de poliestireno expandido e mantidos em câmara a 21 ± 1 °C e 85-90% UR por 8 (tangerina ‘Poncã’) ou 7 dias (laranja ‘Valência’). Os frutos foram analisados

quanto à incidência e severidade da doença, período de incubação e período latente do fungo, perda de massa da matéria fresca e produção de CO₂. No caso da tangerina ‘Poncã’, a biomassa cítrica foi capaz de reduzir a incidência em 76,3%, em comparação à testemunha, no terceiro dia, e reduzir também a severidade em 44%, no quarto dia. Para o período de incubação, com exceção dos frutos tratados com óleo de alho, observa-se formação de grupos de médias distintos entre a testemunha e aqueles tratados com produtos alternativos, indicando capacidade de atrasar o surgimento de sintomas da doença. A biomassa cítrica destacou-se, apresentando resultado semelhante ao fungicida tiofanato metílico, atrasando o período de incubação em um dia em relação à água. O mesmo foi observado para o período latente, em que os frutos tratados com produtos alternativos, exceto óleo de alho, situaram-se em um grupo distinto da testemunha. Embora os frutos de todos os tratamentos superassem a testemunha, o imazalil foi capaz de melhor preservar a turgidez dos frutos, apresentando os menores valores de perda de massa da matéria fresca no oitavo dia de avaliação (5,2%). A perda de massa e a produção de CO₂ se correlacionaram positivamente com a incidência e severidade, ou seja, as maiores perdas de massa e maiores taxas respiratórias decorrem de altos valores de incidência e severidade. No caso da laranja ‘Valência’, biomassa cítrica e quitosana reduziram a incidência e severidade durante todo o período experimental. No sétimo dia após a inoculação, a incidência foi reduzida em 73,7% e 67,4% pela biomassa cítrica e quitosana, respectivamente, em comparação com a testemunha água, enquanto a severidade foi reduzida em 59,6% e 62%, respectivamente. Por outro lado, óleo de nim, óleo de pimenta longa e óleo de alho foram ineficazes em controlar o patógeno. Imazalil e tiofanato metílico controlaram totalmente a doença durante o período de avaliação. A perda de massa da matéria fresca foi crescente ao longo do tempo, porém, os frutos de todos os tratamentos apresentaram valores aceitáveis para a comercialização, situados na faixa de 3 a 5%. Quanto à produção de CO₂, os fungicidas mantiveram a taxa respiratória dos frutos baixa, seguidos em ordem crescente pela quitosana e, posteriormente, pelos demais produtos. Dessa maneira, conclui-se que a biomassa cítrica tem bom potencial para controle do bolor verde em tangerina ‘Poncã’, enquanto biomassa cítrica e quitosana são capazes de controlar a doença em laranja ‘Valência’.

ABSTRACT

MARO, Luana Aparecida Castilho, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2010. **Control of green mold in citrus with alternatives to pesticides.** Adviser: Luiz Carlos Chamhum Salomão. Co-Advisers: Olinto Liparini Pereira, Paulo Roberto Cecon and Dalmo Lopes de Siqueira.

The green mold, caused by *Penicillium digitatum*, is a major disease in the post-harvest of citrus fruit. In this work the effects of alternatives to agrochemicals in the control of green mold in ‘Ponkan’ tangerines and ‘Valencia’ oranges were tested. Physiologically mature fruits were superficially wounded in the equatorial region with a tube of 9 mm in diameter filled with needles and inoculated with a conidial suspension of *P. digitatum* at a concentration of 1×10^6 conidia/mL. After air drying, they were sprayed to full wetting with distilled water (control), distilled water + 8 mL/L Tween 20, imazalil (200 mL EC/100 Magnate® 500 L of water), thiabendazole (103 mL Tecto® SC/100 L of water), methyl thiophanate (70 g Cercobin® 700 WP/100 L of water), chitosan 10 mL/L of water or essential oils of garlic 10 mL/L of water, clove 5 mL/L water, neem 10 mL/L of water, long pepper 5 mL/L of water and citric biomass 10 mL/L of water. To the essential oils and chitosan were added 8 mL/L Tween 20. Then the fruits were packed in groups of three in polystyrene trays and kept at 21 ± 1 °C and 85-90% RH for 8 (‘Ponkan’ tangerine) or 7 days (‘Valencia’ orange). The fruits were analyzed for incidence and severity of illness, incubation period and latent period of the fungus, loss of fresh weight and CO₂ production. In the case of ‘Ponkan’ tangerine,

citric biomass was able to reduce the incidence of 76.3% compared to the control, in the third day, and also reduce the severity in 44%, in the fourth day. For the incubation period, except for fruits treated with garlic oil, there is formation of distinct groups of averages between the control and those treated with alternative products, indicating capacity to delay the onset of symptoms. Citric biomass stood out, showing similar results to the fungicide methyl thiophanate, delaying the incubation period in a day in relation to the water. The same was observed for the latent period, in which the fruits treated with alternative products, except garlic oil, stood in a group other than the control. Although the fruits of all treatments overcome the control, imazalil was able to better maintain the turgidity of the fruit, showing the lower values of loss of fresh weight on the eighth day of evaluation (5.2%). The mass loss and CO₂ production correlated positively with the incidence and severity, in other words, the largest mass losses and higher respiratory rates result from high values of incidence and severity. In the case of 'Valencia' orange, citric biomass and chitosan reduced the incidence and severity during the entire experimental period. On the seventh day after inoculation, the incidence was reduced by 73.7% and 67.4% by citric biomass and chitosan, respectively, in comparison to control water, while the severity was reduced by 59.6% and 62%, respectively. On the other hand, neem oil, long pepper oil and garlic oil were ineffective in controlling the pathogen. Imazalil and methyl thiophanate totally controlled the disease during the evaluation period. The loss of fresh weight was increasing over time, however, fruits of all treatments had acceptable values for the marketing, located in the range 3 until 5%. As for CO₂ production, fungicides maintained the respiratory rate low, followed in ascending order by chitosan and subsequently by other products. Thus, the citric biomass has good potential for control of green mold on 'Ponkan', while citric biomass and chitosan are capable of controlling the disease in 'Valencia' orange.

INTRODUÇÃO GERAL

Dentre as frutas produzidas no Brasil, os citros lideram em termos de quantidade, com aproximadamente 21 milhões de toneladas no ano de 2007, em uma área colhida superior a 929 mil hectares, situando o país como o maior produtor mundial de citros e maior exportador de suco de laranja (Agriannual, 2009). No entanto, a exportação de frutos para consumo *in natura* ainda é incipiente devido a uma série de fatores, dentre os quais se podem destacar: restrições sanitárias e, principalmente, a exigência de qualidade por parte do mercado externo.

A fruta cítrica brasileira apresenta, via de regra, aspecto visual ruim. Isso se deve ao clima, que influi na coloração dos frutos, principalmente em regiões com temperaturas elevadas que não propiciam amplitude térmica ideal para que a casca atinja coloração alaranjada e a uma quantidade enorme de doenças que levam a uma depreciação do produto final (Toffano, 2005). Os danos decorrentes do manuseio durante a colheita, transporte e embalagem constituem fator importante para desvalorização dos frutos, uma vez que facilitam a penetração de patógenos.

As podridões constituem a principal causa de danos pós-colheita em citros e se expressam desde a colheita até seu uso pelo consumidor. A ocorrência de frutos cítricos com podridões em uma safra varia de 3 a 6% (Palou *et al.*, 2001), podendo chegar, sob condições favoráveis, a 50% de perdas (Eckert, 1993). Dantas *et al.* (2003) detectaram doenças em 21,8% das laranjas ‘Pêra’ amostradas durante seis meses na Central de Abastecimento de Recife. Em levantamento da incidência de podridões em laranjas ‘Pera’ e ‘Lima’ e tangor ‘Murcott’ realizado em atacadistas da Ceagesp, (Fischer *et al.*,

2008) constataram valores médios de 12,8; 14,9 e 25,8%, respectivamente. Esses resultados mostram a importância econômica das doenças em pós-colheita de frutos cítricos, uma vez que a maioria delas desqualifica o fruto para comercialização.

Das várias doenças pós-colheita de frutos cítricos, o bolor verde, causado por *Penicillium digitatum* (Pers.: Fr.) Sacc., é uma das mais importantes (Eckert e Eaks, 1989; Holmes e Eckert, 1999; Franco e Bettiol, 2002; Feichtenberger *et al.*, 2005). Seu agente causador se encontra disseminado em todos os países produtores e todas as espécies e cultivares cítricos são suscetíveis.

O bolor verde causa podridão mole em frutos, que se inicia por pequenas anasarcas na superfície da casca que, rapidamente, aumentam de tamanho até tomarem todo o fruto. O fungo desenvolve um micélio branco sobre o tecido afetado, que depois é revestido por uma densa massa de esporos de cor verde (Feichtenberger *et al.*, 2005). Este patógeno tem ciclo de vida curto (3 a 5 dias a 25 °C), e as colônias formadas em um único fruto podem produzir de 1 a 2 bilhões de conídios que são eficientemente dispersos via correntes de ar (Holmes e Eckert, 1995). A alta capacidade de esporulação do patógeno desempenha papel importante no desenvolvimento de resistência aos fungicidas utilizados no controle desta doença (Santos e Matos, 2006). O desenvolvimento das lesões é rápido, e as massas de esporos verdes são circundadas por ampla faixa de crescimento fúngico branco, que é separada da área sadia por estreita camada de tecido de casca encharcado. Em condições de elevada umidade, a podridão mole provoca rápida e completa desintegração no fruto e, em ambiente seco, estes murcham e mumificam (Feichtenberger *et al.*, 2005). Uma vez alterada sua consistência, o fruto desprende um odor característico e torna-se impróprio para o consumo humano.

Para o controle do bolor verde, são recomendadas práticas culturais visando redução do inóculo no campo, como eliminação de frutos infectados, cuidados na colheita e transporte para evitar ferimentos, higienização constante dos equipamentos de colheita e transporte e das instalações para o processamento e armazenamento dos frutos, controle de insetos e roedores e armazenamento imediato a 10 °C ou menos. No entanto, o tratamento químico é o método mais utilizado, sendo recomendados os fungicidas do grupo benzimidazol e imidazol (Agrofit, 2009).

Os fungicidas do grupo benzimidazol e imidazol são muito utilizados no Brasil, porém, possuem várias restrições, podendo selecionar isolados resistentes do patógeno quando usados continuamente (Franco & Bettiol, 2002). A preocupação mundial com

relação à poluição ambiental e aos riscos à saúde promovidos pelos agrotóxicos, somada à resistência de patógenos a fungicidas e à retirada de alguns produtos do mercado, tem levado ao aumento das pesquisas envolvendo a utilização de produtos alternativos e potenciais indutores de resistência para o controle de doenças em pós-colheita (Cia *et al.*, 2007).

A busca de alternativas de controle visando à redução do uso de agroquímicos contribui para a sustentabilidade e a competitividade do agronegócio citrícola. Além disso, favorece a abertura de novos nichos de mercado pela oferta de um produto diferenciado, de alto valor agregado e de melhor qualidade. Também possibilita a exportação, uma vez que os mercados consumidores internacionais de frutas *in natura* vêm determinando procedimentos fitossanitários rigorosos para proteção de seus campos de produção contra a entrada de novas pragas.

Durante o desenvolvimento dos frutos e após sua colheita, a resistência natural a doenças geralmente declina, acarretando inevitáveis processos de infecção, doença e morte. O declínio da resistência natural dos frutos pode ativar infecções quiescentes e aumentar a severidade/incidência de doenças (Terry e Joyce, 2004). Assim, estratégias que visem à proteção do hospedeiro nas fases de maior suscetibilidade, são importantes num programa de controle da doença. Produtos alternativos podem controlar doenças por meio da ativação de respostas de resistência nos tecidos vegetais, indução do acúmulo de proteínas relacionadas à patogênese ou pelo efeito direto sobre microrganismos (Cia *et al.*, 2007).

As plantas possuem mecanismos estruturais e bioquímicos que podem contribuir para sua resistência contra patógenos. Nas interações patógeno-hospedeiro, o patógeno utiliza substâncias químicas tais como hormônios, enzimas e toxinas para atacar o hospedeiro que, por sua vez, procura se defender por meio de mecanismos estruturais ou bioquímicos, que podem ser subdivididos em pré-formados e pós-formados. Os mecanismos pós-formados é que são de interesse no fenômeno de indução de resistência (Pascholati e Leite, 1995). A expressão da resistência induzida em plantas envolve a morte de células hipersensíveis do hospedeiro circundando os sítios de infecção e aumento da síntese de fitoalexinas e proteínas relacionadas à patogênese, como peroxidases (Guest, 1998).

Stange *et al.* (1993) relataram a presença de um composto antifúngico identificado como 3-[4-hidroxi-3-(metil-2-butenil) fenil]-2-(E)-propenal em exocarpo de limões feridos e verificaram, ainda, aumento de sua concentração com o tempo,

resultando na completa limitação da invasão de *P. digitatum*. Observações semelhantes foram feitas por Afek *et al.* (1999) em albedo de pomelos maduros não inoculados, tendo encontrado uma hidroxycoumarina, a umbeliferona, em baixa concentração ($2\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). Após inoculação com *P. digitatum*, a concentração de umbeliferona foi de $28\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Em kumquat, limões, laranjas, lima-ácida e toranjas, o acúmulo de escoparona, uma fitoalexina dos frutos cítricos amplamente estudada, foi detectado em frutos mantidos a $36\text{ }^{\circ}\text{C}$ após inoculação com *P. digitatum* (Ben-Yehoshua *et al.*, 1992). O aumento desses compostos sugere participação dos mecanismos de defesa contra patógenos.

Inúmeros trabalhos têm mostrado a eficiência de extratos e óleos essenciais, obtidos a partir de diversas espécies botânicas, no controle de fitopatógenos pela inibição do crescimento micelial, indução da lise e evacuação do citoplasma (Fiori *et al.*, 2000). A inibição do crescimento fúngico pelo uso de óleos essenciais envolve também alterações na composição da parede celular (Ghfir *et al.*, 1997), bem como destruição da membrana plasmática e desorganização da estrutura mitocondrial (De Billerbeck *et al.*, 2001).

O nim (*Azadiractha indica*) é uma planta originária da Índia pertencente à família *Meliaceae*, reconhecida por suas propriedades terapêuticas, nematicidas, fungicidas e inseticidas. Dentre os princípios ativos, destaca-se a azadirachtina, que exibe boa eficácia contra importantes pragas e doenças na agricultura (Mossini & Kimmelmeier, 2005), podendo ser uma alternativa promissora no controle de podridões pós-colheita de frutos. O extrato oleoso das sementes da planta em concentrações inferiores a 0,5% diminuiu acentuadamente a produção de patulina, micotoxina produzida por *P. expansum*, principal contaminante em maçãs e derivados (Arroteia *et al.*, 2007).

Conhecida popularmente por pimenta longa, *Piper hispidinervum* também vem sendo estudada como estratégia de controle de doenças em plantas. Trata-se de um arbusto da família *Piperaceae*, encontrado em condições silvestres no vale do Rio Acre, no estado do Acre (Zacaroni *et al.*, 2009), grande produtor de óleo essencial rico em safrol, um componente químico empregado como agente sinérgico de inseticidas (Sousa *et al.*, 2001). Nascimento *et al.* (2008) observaram que o óleo essencial de pimenta longa apresentou inibição de 100% sobre o crescimento micelial de *Alternaria alternata* na concentração de $1000\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

Os condimentos também têm sido alvo de estudos para controle de fitopatógenos. *Caryophyllus aromaticus*, conhecida popularmente por cravo-da-índia, teve suas propriedades antifúngicas relatadas em diversos trabalhos. Rozwalka *et al.* (2008) descreveram a eficiência do óleo essencial de cravo, a 10%, em controlar *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloesporioides* em frutos de goiaba. O óleo de cravo na concentração de 0,01% mostrou também ser promissor no controle de *Rhizopus* spp. em pêssegos, cultivar Diamante, reduzindo significativamente a incidência da doença quando comparado aos fungicidas utilizados em fruticultura (Carvalho *et. al.*, 2009). Tais propriedades fungitóxicas de condimentos foram confirmadas em trabalhos conduzidos por Botelho *et al.* (2009), em que o extrato de alho promoveu redução do crescimento micelial *in vitro* de *Elsinoë ampelina* para todas as doses testadas, que variaram de 0,0615 a 1,5%. Encontrada sob a forma de um precursor inativo, o princípio ativo do alho (*Allium sativum*), a alicina, exerce efeito antimicrobiano somente após perda da integridade das células do bulbo (Araújo *et al.*, 2009). Souza *et al.* (2007), testando extrato de alho para controle *in vitro* de *Fusarium proliferatum* em grãos de milho, observaram redução da taxa de crescimento micelial, da germinação dos esporos e da incidência, sendo a melhor eficiência a partir da concentração 2,5%.

A quitosana, um polissacarídeo catiônico de alta massa molecular produzido pela desacetilação da quitina, possui efeito fungistático, além de modificar a atmosfera e induzir respostas de resistência nos tecidos vegetais (Terry & Joyce, 2004). A atividade fungicida da quitosana tem sido bem relatada em estudos, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Bautista-Baños *et al.*, 2006), como observado por El Ghaouth *et al.* (1992) no controle de podridões incitadas por *Rhizopus stolonifer* e *Botrytis cinerea* em morangos. Camili *et al.* (2007) verificaram que a solução de quitosana nas concentrações de 1,5 e 2%, suprimiu o crescimento micelial e retardou a germinação de conídios de *Botrytis cinerea* em uvas 'Itália'. Terry & Joyce (2004) relataram que o tratamento com quitosana não apenas pode ter efeito direto sobre o patógeno como ainda eliciar o acúmulo de quitinase, fitoalexinas e inibidores de protease e, também, promover a lignificação.

A biomassa cítrica, formulação heterogênea contendo polifenóis, flavonoides, fitoalexinas e ácidos orgânicos diluídos, que atuam como microbiostáticos, vem sendo estudada como possível agente alternativo para controle de doenças em pós-colheita de frutos. Este produto aplicado *in vitro* na concentração de 1000 µL. L⁻¹ inibiu totalmente

o crescimento micelial de *Monilinia fructicola* em pêssegos (Abreu *et al.*, 2008). Benato *et al.* (2002) verificaram a eficiência da biomassa cítrica em reduzir o índice de doença de maracujás-amarelos armazenados a 70-80% UR. Além do controle de doenças em plantas por sua atividade antimicrobiana direta, o extrato cítrico pode induzir resistência, como observado por Motoyama *et al.* (2003). Em trabalho realizado por esses autores, o extrato cítrico apresentou atividade elicitora, induzindo a síntese das fitoalexinas gliceolina em cotilédones de soja e desoxiantocianidinas em mesocótilos de sorgo.

Sabendo-se da atividade antifúngica de óleos e extratos vegetais sobre fitopatógenos, o presente trabalho objetivou avaliar o efeito de produtos alternativos aos agroquímicos no controle pós-colheita do bolor verde em frutos cítricos e comparar seus efeitos com os de fungicidas registrados para uso pós-colheita em citros.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abreu, F. M.; Lourenço, S. A.; Bassetto, E.; Gonçalves, F. P.; Martins, M. C.; Amorim, L. Efeito de sanificantes no controle pós-colheita da podridão parda (*Monilinia fructicola*) e da podridão mole (*Rhizopus stolonifer*) em pêssegos. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 34, n. 1, p. 83-85, 2008.

Afek, U.; Orenstein, J.; Carmeli, S.; Rodov, V.; Bar, J. M. Umbelliferone: a phytoalexin associated with resistance of immature Marsh grapefruit to *Penicillium digitatum*. **Phytochemistry**, v. 50, p. 1129-1132, 1999.

AGROFIT. **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários**. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons> Acesso em: 06 de dezembro de 2009.

AGRIANUAL. Anuário da Agricultura Brasileira. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio, p. 271-300, 2009.

Araújo, R. C. Z.; Chalfoun, S. M.; Angélico, C. L.; Araújo, J. B. S.; Pereira, M. C. Avaliação *in vitro* da atividade fungitóxicas de extratos de condimentos na inibição de fungos isolados de pães artesanais. **Ciência & Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 2, p. 545-551, 2009.

Arroteia, C. C.; Kemmelmeier, C.; Machinski Junior, M. Efeito dos extratos aquoso e oleoso de nim [*Azadirachta indica* A. Juss (Meliaceae)] na produção de patulina em maçãs contaminadas por *Penicillium expansum*. **Ciência Rural**, v.37, n.6, p.1518-1523, 2007.

Bautista-Baños, S.; Hernández-Lauzardo, A.N.; Velázquez-del Valle, M.G.; Hernández-López, M.; Ait Barka, E.; Bosquez-Molina, E.; Wilson, C.L. Chitosan as a potential

natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. **Crop Protection**, v. 25, p. 108–118, 2006.

Benato, E. A.; Sigrist, J. M. M.; Hanashiro, M. M.; Magalhães, M. J. M. e Binotti, C. S. Avaliação de fungicidas e produtos alternativos no controle de podridões pós-colheita em maracujá-amarelo. **Summa Phytopathologica**, v. 28, n. 4, p. 299-304, 2002.

Ben Yehoshua, S.; Rodov, V.; Kim, J. J.; Carmelli, J. T. Preformed and induced antifungal materials of citrus fruits in relation to enhancement of decay resistance by heat and UV treatment. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 1217-1221, 1992.

Botelho, R. V.; Maia, A. J.; Pires, E. J. P.; Terra, M. M. Efeito do extrato de alho na quebra de dormência de gemas de videiras e no controle *in vitro* do agente causal da antracnose (*Elsinoe ampelina* Shear). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 1, p. 96-102, 2009.

Camili, E. C.; Benato, E. A.; Pascholati, S. F.; Cia, P. Avaliação da quitosana, aplicada em pós-colheita, na proteção de uva 'Itália' contra *Botrytis cinerea*. **Summa Phytopathologica**, v. 33, n. 3, p 215-221, 2007.

Carvalho, V. L.; Cunha, R. L.; Chalfun, N. N. J.; Moura, P. H. A. Alternativas de controle pós-colheita da podridão-parda e da podridão-mole em frutos de pessegueiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 1, p. 078-083, 2009.

Cia, P.; Pascholati, S. F.; Benato, E. A. Indução de resistência no manejo de doenças pós-colheita. In: Rodrigues, F. Á.; Romeiro, R. D. S. (Ed.). **Indução de resistência em plantas a patógenos**. Viçosa: UFV, Imprensa Universitária, p. 245-280, 2007.

Dantas, S. A. F., Oliveira, S. M. A., Michereff, S. J.; Nascimento, L. C., Gurgel, L. M. S.; Pessoa, W. R. L. S. Doenças fúngicas pós-colheita em mamões e laranjas comercializados na Central de Abastecimento do Recife. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 528-533, 2003.

De Billerbeck, V. G.; Roques, C. G.; Bessiere, J. M.; Fanvieuille, J. L.; Dargent, R. Effect of *Cymbopogon nardus* (L.) W. Watson essential oil on the growth and morphogenesis of *Aspergillus niger*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 9-17, 2001.

Eckert, J. W.; Eaks, I. L. Postharvest disorders and diseases of citrus fruits. In: Reuther, W.; Calavan, E. C.; Carman, G. E. (Ed.). **The Citrus Industry**. Berkeley: University of California Press, v. 4, p.179-260, 1989.

Eckert, W. J. Post-harvest diseases of citrus fruits. **Agriculture Outlook**, v. 54, p. 225-232, 1993.

El Ghaouth, A.; Arul, J.; Grenier, J.; Asselin, A. Antifungal activity of chitosan on two postharvest pathogens of strawberries fruits. **Phytopathology**, v. 82, n. 4, p. 398-402, 1992.

- Feichtenberger, E.; Bassanezi, R. B.; Spósito, M. B.; Belasque, J. Doenças dos citros. In: Kimati, H. A. L.; Rezende, J. A. M.; Bergamin Filho, A. & Camargo, L. E. A., (Ed.). **Manual de Fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres Ltda, p. 239-271, 2005.
- Fiori, A. C. G.; Schwan-Estrada, K. R. F.; Stangarlin, J. R.; Vida, J. B.; Scapim, C. A. ; Cruz, M. E.S.; Pascholati, S. F. Antifungal activity of leaf extracts and essential oils of some medicinal plants against *Didymella bryoniae*. **Journal of Phytopathology**, v. 148, p. 483-487, 2000.
- Fischer, I. H., Lourenço, S. A.; Amorim, L. Doenças pós-colheita em citros e caracterização da população fúngica ambiental no mercado atacadista de São Paulo. **Tropical Plant Pathology**, v. 33, n. 3, p. 219-226, 2008.
- 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**, v. 24, n. 2, p. 569-572, 2002.
- Ghfir, B.; Fonvieille, J.L.; Dargent, R. Influence of essential oil of *Hyssopus officinalis* on the chemical composition of the walls of *Aspergillus fumigatus* (Fresenius). **Mycopathologia**, v. 138, p. 7-12, 1997.
- Guest, D. Induced Barriers to Infection. In: Johnson, G. I.; Highley, E.; Joyce, D. C.; (Ed.). Disease Resistance in Fruit. International Workshop held at Chiang Mai, Thailand. **Proceedings ...** Thailand: ACIAR Proceedings, n. 80, p. 34-37, 1998.
- Holmes, G. J.; Eckert, J. W. Relative fitness of Imazalil-resistant and -sensitive biotypes of *Penicillium digitatum*. **Plant Disease**, v. 79, p. 1068-1073, 1995.
- _____. Sensitivity of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* to postharvest citrus fungicides in California. **Phytopathology**, v. 89, n. 9, p. 716-721, 1999.
- Mossini, S. A. G.; Kimmelmeier, C. A árvore Nim (*Azadirachta indica* A. Juss): Múltiplos Usos. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 24, n. 1, p. 139-48, 2005.
- Motoyama, M. M.; Schawan-Estrada, K. R. F.; Stangarlin, J. R.; Fiori-Tutida, A. C. G.; Scapim, C. A. Indução de fitoalexinas em soja e em sorgo e efeito fungitóxico de extratos cítricos sobre *Colletotrichum lagenarium* e *Fusarium semitectum*. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 25, p. 491-496, 2003.
- Nascimento, F. R.; Cardoso, M. G.; Souza, P. E.; Lima, R. K.; Salgado, A. P. S. P.; Guimarães, L. G. L. Efeito do óleo essencial de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC) e do emulsificante Tween® 80 sobre o crescimento micelial de *Alternaria alternata* (Fungi: Hyphomycetes). **Acta Amazonica**, v. 38, n. 3, p. 503-508, 2008.
- Palou, L.; Usall, L.; Pons, J.; Cerdà, M. & Viñas, I. Micoflora em centrais citrícolas de Tarragona. **Revista Investigación Agraria: Production Protección Vegetal**, v. 16, p. 447-462, 2001.
- Pascholati, S. F.; Leite, B. Hospedeiro: Mecanismos de Resistência. In: Filho, B.; Kimati, H. & Amorim, L.; (Ed.). **Manual de Fitopatologia**. São Paulo-SP: Agronômica Ceres, p. 417-453, 1995.

Rozwalka, L. C.; Lima, M. L.R. Z. C.; Mio, L. L. M.; Nakashima, T. Extratos, decoctos e óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas na inibição de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides* de frutos de goiaba. **Ciência Rural**, v. 38, n. 2, p. 301-307, 2008.

Santos, H. P. S. F.; Matos, A. P. Doenças dos Citros. In: Oliveira, S. M. A.; Terao, D.; Dantas, S. A. F. & Tavares, S. C. C. H.; (Ed.). **Patologia pós-colheita: frutas, olerícolas e ornamentais tropicais**. Brasília-DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2006.

Sousa, M. M. M.; Lédo, F. J. S.; Pimentel, F. A. Efeito da adubação e do calcário na produção de matéria seca e de óleo essencial de pimenta-longa. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n. 3, p. 405-409, 2001.

Souza, A. E. F.; Araújo, E.; Nascimento, L. C. Atividade antifúngica de extratos de alho e capim-santo sobre o desenvolvimento de *Fusarium proliferatum* isolado de grãos de milho. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, n. 6, p. 465-471, 2007.

Stange, R. R.; Midland, S. L.; Eckert, J. W.; Sims, J.J. An antifungal compound produced by grapefruit and Valencia orange after wounding of the peel. **Journal of Natural Products**, v. 56, p. 1627-1629, 1993.

Terry, L. A.; Joyce, D. C. Elicitors of induced disease resistance in postharvest horticultural crops: a brief review. **Postharvest Biology and Technology**, v. 32, p. 1-13, 2004.

Toffano, L. **Doenças pós-colheita de citros: potencial do *Lentinula edodes*, *Agaricus blazei*, ácido jasmônico albedo (*Citrus sinensis* var. Valência) e flavedo (*Citrus aurantifolia* var. Tahiti) no controle e na indução de resistência**. 2005. 86 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

Zacaroni, L. M.; Cardoso, M. G.; Souza, P. E.; Pimentel, F. A.; Guimarães, L. G. L.; Salgado, A.P. S. P. Potencial fungitóxico do óleo essencial de *Piper hispidinervum* (pimenta longa) sobre os fungos fitopatogênicos *Bipolaris sorokiniana*, *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum gloeosporioides*. **Acta Amazônica**, v. 39, n. 1, p. 193-198, 2009.

CAPÍTULO 1

CONTROLE DO BOLOR VERDE EM TANGERINAS ‘PONCÃ’ COM PRODUTOS ALTERNATIVOS AOS AGROQUÍMICOS

RESUMO

Foram avaliados os efeitos de produtos alternativos aos agroquímicos no controle do bolor verde (*Penicillium digitatum*) em pós-colheita de tangerinas ‘Poncã’. Frutos no estágio fisiológico maduro com $42,7 \pm 2,3\%$ p/p de suco, $10,8 \pm 0,5$ ° Brix e massa média de $265 \pm 16,9$ g foram lavados, desinfestados e inoculados com 100 µL de uma suspensão de conídios de *P. digitatum* na concentração de 1×10^6 conídios/mL sobre um ferimento de cerca de 1 mm de profundidade e 9 mm de diâmetro na região equatorial do fruto. Após a secagem da suspensão de inóculo, foram pulverizados até o molhamento completo com água destilada, água destilada + 8 mL/L de tween 20, imazalil (200 mL de Magnate® 500 EC/100 L de água), thiabendazole (103 mL de Tecto® SC/100 L de água), tiofanato metílico (70 g de Cercobin® 700 WP/100 L de água), quitosana 10 mL/L de água ou óleos essenciais de alho 10 mL/L de água, cravo-da-índia 5 mL/L de água, nim 10 mL/L de água, pimenta longa 5 mL/L de água e biomassa cítrica 10 mL/L de água. Os óleos essenciais e a quitosana foram acrescidos de 8 mL/L de tween 20. Os frutos foram acondicionados em grupos de três, em

bandejas de poliestireno expandido e armazenados em câmara a 21 ± 1 °C e 85-90% UR, onde permaneceram por oito dias. Avaliaram-se a incidência e a severidade da doença, período de incubação e período latente do fungo, perda de matéria fresca e a produção de CO₂. Biomassa cítrica reduziu em 76,3% a incidência aos três dias após a inoculação, em relação à água, e seus efeitos se igualaram aos dos demais produtos alternativos e da água no quarto dia após a inoculação. Quanto à severidade, biomassa cítrica foi eficiente em conter o crescimento do patógeno até o 4º dia após a inoculação, reduzindo a área afetada pela doença em 44% em comparação com a água e igualando-se estatisticamente ao tiofanato metílico e thiabendazole. O imazalil reduziu a incidência em 70% e a severidade em 82,7% aos 8 dias após inoculação, apresentando o maior controle do bolor verde. Os produtos alternativos, exceto o óleo de alho, foram eficientes na extensão do período de incubação, destacando-se a biomassa cítrica que atrasou o aparecimento da doença em um dia em relação à testemunha. Quanto ao período latente, o óleo de alho foi o único produto alternativo que não apresentou potencial para ser utilizado no controle de *P. digitatum* em tangerinas ‘Poncã’. A perda de massa da matéria fresca foi influenciada pelos produtos testados. Embora os produtos alternativos tenham formado grupos de médias distintos da testemunha, apenas o imazalil apresentou valor dentro do limite aceitável para a comercialização de tangerinas, situado entre 3 e 5%. Os frutos tratados com água, água + tween 20 e óleo de alho exibiram as maiores taxas respiratórias demonstrando sua relação com a severidade e incidência, pois, nesses frutos, o ataque do patógeno foi mais intenso em decorrência da ineficiência dos produtos.

1. INTRODUÇÃO

As tangerinas constituem o segundo grupo de frutos cítricos de maior importância na citricultura mundial. Em 2007, a área plantada com tangerinas no Brasil foi de 59.637 hectares, com produção de 1.205.580 toneladas (FAO, 2009). As regiões Sudeste e Sul se destacam na produção, sendo o Estado de São Paulo o maior produtor de tangerinas, seguido por Rio Grande do Sul e Paraná (Agrianual, 2009).

A 'Poncã' é considerada a 'rainha das tangerinas do Brasil' (Margarim *et al.*, 2007), destacando-se pelo sabor agradável, coloração atrativa e facilidade com que pode ser descascada.

Embora o Brasil seja o maior produtor mundial de citros, a participação no mercado internacional de frutas *in natura* é incipiente, devido a uma série de fatores. Para o consumidor estrangeiro, as variedades de tangerinas plantadas no Brasil não atendem à exigência para serem consumidas como frutas frescas devido à presença de sementes. Ainda se destaca como problema a ocorrência de doenças como o bolor verde, que está presente em todos os países produtores e ataca todas as variedades cítricas, principalmente as laranjas e tangerinas (Laranjeira *et al.*, 2005). No caso dessas últimas, a característica do fruto contribui para expressivos danos pós-colheita, propiciando a infecção por *P. digitatum* os gomos soltos com casca pouco aderente e baixíssima resistência a danos mecânicos decorrentes do processo de colheita, manuseio, embalagem e transporte. Santos *et al.* (2008) verificaram que o percentual de

tangerinas com sintoma de podridão por *P. digitatum* ao final de uma semana em temperatura ambiente é significativamente influenciado pelo dano de compressão. Em adição, as tangerinas comumente passam pelo processo de desverdecimento mediante aplicação de etileno em pós-colheita (Martins, 2003), contribuindo para a expressão dos sintomas de doenças (Whiteside *et al.*, 1993), uma vez que o desverdecimento parece aumentar a suscetibilidade das frutas às podridões (Petracek *et al.*, 1997).

O mercado internacional, além da qualidade das tangerinas, passou a exigir controle sobre todo o sistema de produção, incluindo análise de resíduos nos alimentos e estudo sobre o impacto ambiental, para suas importações (Margarim *et al.*, 2007). A adequação das operações relacionadas à pós-colheita, como a redução do uso de defensivos sintéticos, principal medida de controle para bolor verde, será o grande marketing para o sucesso do agronegócio citrícola, além da boa qualidade do fruto (Pio, 1993).

A busca por alternativas de controle é uma tendência mundial face à preocupação com a saúde, o ambiente e a perda do efeito dos princípios ativos dos agroquímicos em função do seu uso contínuo. Estudos desenvolvidos com extratos brutos ou óleos essenciais obtidos de vegetais indicam o potencial no controle de fitopatógenos (Bautista-Baños *et al.*, 2003; Cunico *et al.*, 2003; Mytle *et al.*, 2004; Pereira, *et al.*, 2006).

Franco e Bettioli (2000) propuseram um estudo com sessenta produtos alternativos para controle do bolor verde em laranjas ‘Pera’, incluindo agentes de biocontrole, extratos de plantas, produtos alimentares, aditivos e resíduos da produção de alimentos, e verificaram que sais alimentares utilizados como conservadores de alimentos, *Gliocladium roseum* e *Cymbopogon citratus*, apresentaram potencial de uso para o controle da doença. Em 2002, os mesmos autores estudaram o efeito isolado e combinações de produtos alternativos no mesmo patossistema do trabalho anterior e novamente comprovaram a eficiência de produtos alternativos.

Pelo exposto, objetivou-se avaliar o efeito de óleos essenciais obtidos a partir de espécies botânicas, biomassa cítrica e quitosana no controle de *P. digitatum* em tangerinas ‘Poncã’ e comparar com os efeitos de fungicidas recomendados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para o controle de doenças pós-colheita em citros.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Tangerinas ‘Poncã’ (*Citrus reticulata* Blanco) foram obtidas de pomar comercial em Tocantins (latitude: 21°10’30” S; longitude: 43°01’04” W e altitude: 363m), Minas Gerais, em 10 de julho de 2009. Os frutos foram colhidos no estágio fisiológico maduro e apresentavam $42,7 \pm 2,3\%$ p/p de suco e $10,8 \pm 0,5$ °Brix, superando os valores mínimos recomendados para a colheita de tangerinas Poncã que são de 35% p/p de suco e 9 ° Brix (PROGRAMA..., 2000), além de ser considerado o aspecto de sanidade para a colheita. Em seguida, foram transportados até o Galpão de Pós-Colheita do Setor de Fruticultura do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa em caixas forradas com plástico-bolha e em camadas únicas para evitar qualquer ferimento. Realizou-se seleção de acordo com ausência de injúrias, uniformidade de cor e tamanho, utilizando-se frutos com massa de $265 \pm 16,9$ g/fruto. Após seleção, as tangerinas foram lavadas com detergente neutro 2 mL/L e enxaguadas duas vezes em água potável. Posteriormente, foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio a 0,5% (v/v) durante três minutos, novamente enxaguadas em água potável por duas vezes e colocadas para secar ao ar.

Após esse processo, os frutos foram feridos em um ponto na região equatorial, a uma profundidade de cerca de 1 mm, com um tubo de aço de 9 mm de diâmetro, tendo seu interior preenchido com agulhas de aço. Após os ferimentos, as tangerinas foram inoculadas com 100 µL de uma suspensão de conídios de *P. digitatum* a uma

concentração de $1,0 \times 10^6$ conídios/mL ajustada com hemacitômetro. Previamente, foram coletadas no pomar experimental da Universidade Federal de Viçosa, tangerinas colonizadas com *P. digitatum* e encaminhadas ao Laboratório de Patologia de Sementes e de Pós-colheita do Departamento de Fitopatologia onde foi efetuado o processo de isolamento direto. O fungo foi cultivado em placas de Petri contendo meio batata dextrose ágar por sete a dez dias a 25 °C em câmara de crescimento.

Uma vez secada a suspensão de inóculo, os frutos foram pulverizados com um dos seguintes produtos até o total molhamento, com auxílio de um borrifador:

- água destilada
- água destilada + 8 mL/L Tween 20
- thiabendazole (103 mL de Tecto® SC /100L de água)
- tiofanato metílico (70 g de Cercobin® 700 WP /100L de água)
- imazalil (200 mL de Magnate® 500 EC /100L de água)
- óleo de alho 'Probinatu®' (10 mL/L) + 8 mL/L Tween 20
- óleo essencial de cravo-da-Índia (5 mL/L) + 8 mL/L Tween 20
- óleo de nim 'Organic Neem®' (10 mL/L) + 8 mL/L Tween 20
- óleo essencial de pimenta longa (5 mL/L) + 8 mL/L Tween 20
- biomassa cítrica 'Biogermex' (10 mL/L) + 8 mL/L Tween 20
- quitosana (10 g/L) + 8 mL/L Tween 20

Os óleos essenciais e demais produtos alternativos adquiridos na sua forma concentrada foram diluídos em água para a concentração desejada e acrescidos do dispersante Tween® 20 (monoleato de sorbitano polioxietileno), um surfactante não-iônico, na concentração de 8 mL/L. No preparo da solução de quitosana, utilizou-se ácido acético glacial para ajuste do pH em torno de 4,3. Em seguida, as tangerinas foram acondicionadas em bandejas de poliestireno expandido e armazenadas em câmara a $21 \pm$ °C e 85-90% de UR, onde permaneceram por oito dias. Diariamente, foram feitas avaliações para acompanhar a incidência e severidade da doença e detectar o período de incubação e o período latente do fungo. Foram realizadas também medições da produção de CO₂ e perda de massa da matéria fresca.

O experimento foi conduzido em parcelas subdivididas no tempo, tendo-se nas parcelas os produtos testados e nas subparcelas, os dias de avaliações (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8). O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com sete repetições, sendo cada unidade experimental constituída de três frutos. Os dados foram submetidos

primeiramente às pressuposições da análise de variância, em que foram verificados quanto à normalidade e homogeneidade de variância ao nível de 5% de probabilidade. Posteriormente, foram analisados por meio das análises de variância e regressão. O modelo ajustado por meio de regressão nas avaliações de perda de massa da matéria fresca foi escolhido com base na significância do coeficiente de regressão no nível de 5% de probabilidade, pelo teste “t” de Student, no coeficiente de determinação e no potencial para explicar o fenômeno biológico. Nos modelos ajustados com regressão não-linear, a escolha foi realizada com base nos dois últimos itens. Os dados foram analisados com auxílio do Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas da Universidade Federal de Viçosa (SAEG, 2007). Para a análise de produção de CO₂, a estatística foi descritiva.

2.1. Avaliações

2.1.1. Incidência

A incidência da doença foi calculada pelo número de frutos sintomáticos em cada tratamento, pela fórmula:

$$\% \text{ Incidência} = (\text{N}^\circ \text{ de frutos sintomáticos} / \text{N}^\circ \text{ total de frutos}) \times 100$$

2.1.2. Severidade

Refere-se à proporção de área de tecido colonizado. Acompanhou-se diariamente a expansão da lesão pela medição de seu diâmetro com fita métrica flexível para acompanhar a curvatura do fruto, e, posteriormente, o diâmetro (D) da lesão foi ampliado para área em cm², descontando-se a área do ferimento utilizado para a inoculação por meio da seguinte fórmula $A = \pi D^2 / 4$.

2.1.3. Período de incubação e período latente

O período de incubação compreendeu o intervalo entre a inoculação até o aparecimento dos primeiros sintomas. Consistiu na análise visual diária com auxílio de uma lupa de 10 aumentos (Figura 1).

Já o período latente compreendeu o período entre a inoculação e o aparecimento dos primeiros sinais do patógeno (ex: crescimento micelial, esporulação do fungo) e engloba o período de incubação, como pode ser observado na Figura 1. Observou-se diariamente a presença de sinais apresentados pelo patógeno.

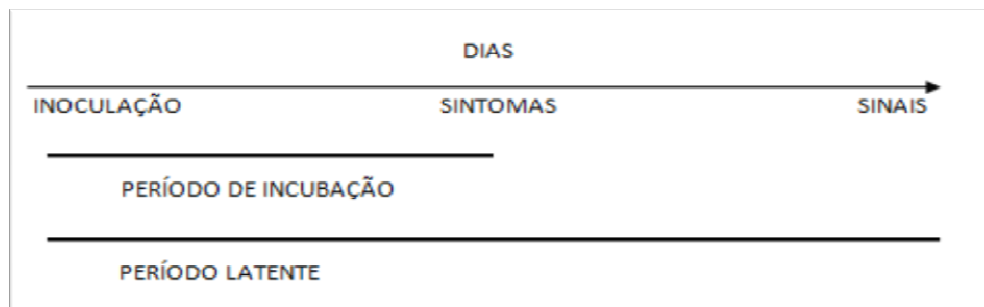


Figura 1 – Representação esquemática do período de incubação e período latente.

2.1.4. Perda de massa da matéria fresca

Os frutos foram pesados em balança eletrônica de precisão de 0,1 g a cada dois dias. Os resultados foram expressos em percentagem, considerando-se a diferença entre a massa inicial do fruto e aquela obtida em cada período de amostragem aplicando-se a seguinte fórmula:

$$\% \text{ PMMF} = (\text{massa inicial} - \text{massa final}) * 100 / \text{massa inicial}$$

2.1.5. Produção de CO₂

A produção de CO₂ pelos frutos foi determinada a cada dois dias, sendo utilizadas quatro repetições para cada tratamento. As determinações foram feitas por cromatografia gasosa, utilizando-se um cromatógrafo a gás Gow Mac série 550 equipado com detector de condutividade térmica.

Grupos de três frutos, que constituíam a unidade experimental, foram acondicionados em frascos de vidro herméticos com volume de 3.280 mL e, após sessenta minutos de retenção dos frutos nos frascos, alíquotas de 1,0 mL de sua atmosfera interna foram retiradas com o uso de seringas e injetadas no cromatógrafo, equipado com coluna de alumínio preenchida com Porapak Q. As condições de trabalho foram as seguintes: fluxo de 40,0 mL por minuto de gás hélio, que foi o gás de arraste; corrente elétrica de 150 mA; temperaturas da coluna, do detector e do injetor de 50, 70 e 80 °C, respectivamente; e temperatura ambiente em torno de 25 °C.

A quantificação de CO₂ produzido foi feita pela tomada das medidas dos comprimentos dos picos registrados nos cromatogramas e sua comparação com os picos referentes à injeção de uma alíquota-padrão composta de 4,99% mol de CO₂ por mol de mistura CO₂ + N₂. Os resultados foram expressos em mg de CO₂ .kg⁻¹ .h⁻¹.

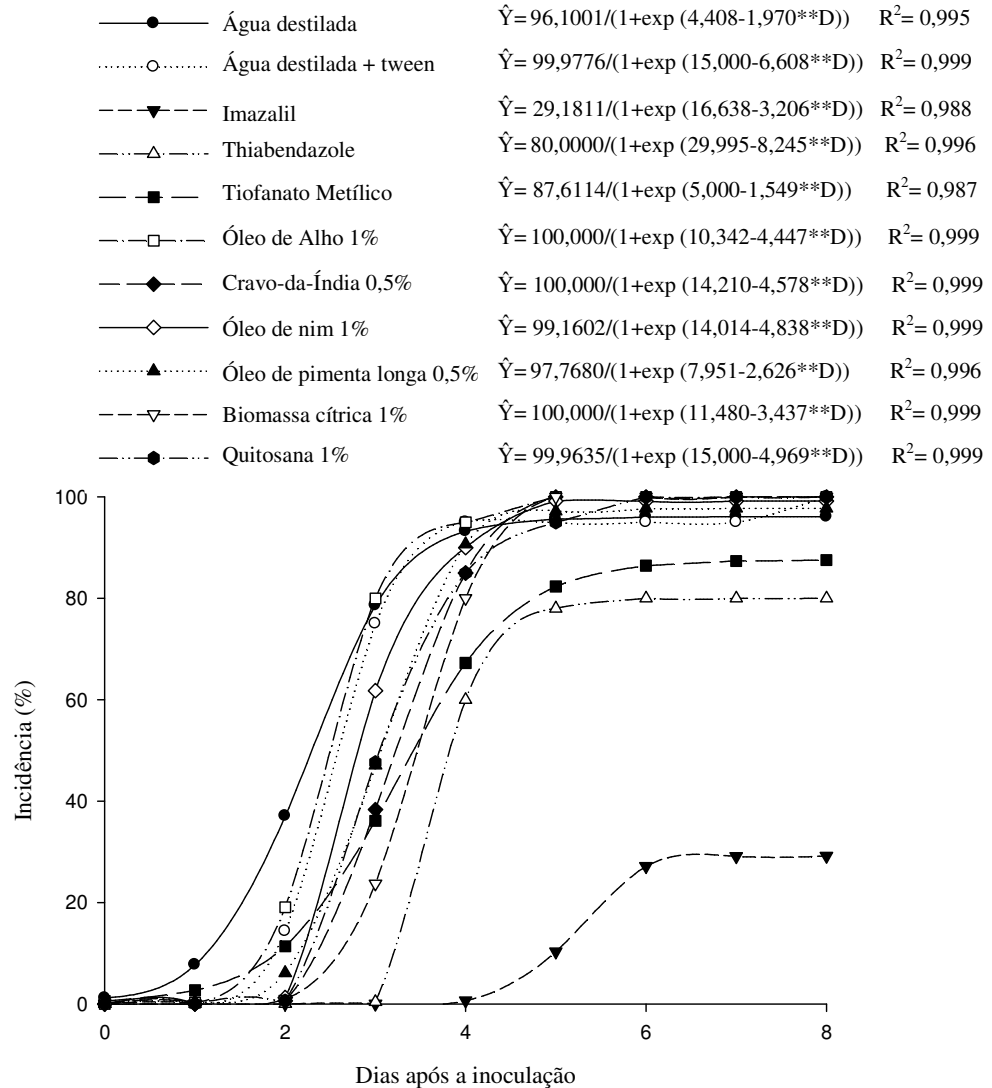
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Incidência

A incidência da doença ajustou-se a um modelo sigmoidal (Figura 2). É possível observar um brusco aumento da incidência, sendo este mais precoce nos frutos tratados com água. Porém, apenas do segundo dia em diante, foram notadas diferenças significativas entre os tratamentos (Tabela 1), com destaque para a quitosana, biomassa cítrica, cravo-da-índia, nim e pimenta longa, que, nesse dia, causaram efeito semelhante ao imazalil e ao thiabendazole.

É fundamental que o produto retarde a incidência da doença, uma vez que a presença de sintomas e sinais desqualifica a fruta para a comercialização. Trata-se de sinais facilmente reconhecidos, principalmente, devido à coloração verde característica dos esporos do patógeno, claramente visualizados pelo consumidor.

Verifica-se que, embora tenham formado grupos de médias distintos da testemunha água, os demais fungicidas não foram efetivos como o imazalil no controle da doença no período estudado, sendo que 80% e 88% dos frutos tratados com thiabendazole e tiofanato metílico, respectivamente, apresentaram a doença aos oito dias (Figura 2).



** Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste 't' de Student

Figura 2 – Estimativa da incidência do bolor verde em tangerinas 'Poncã' inoculadas com *Penicillium digitatum*, tratadas com diferentes fungicidas e produtos alternativos aos agroquímicos e incubadas a $21 \pm 1^\circ\text{C}$ e 85-90% de UR por oito dias (D).

O efeito residual dos fungicidas foi expressivo apenas nos frutos tratados com imazalil, dos quais 28,6% estavam colonizados no final do experimento. Ainda assim, a incidência de frutos colonizados com *P. digitatum* tratados com imazalil pode ser considerada alta por se tratar de um fungicida sistêmico. Oliveira e Toledo (2000) relatam elevados níveis residuais de imazalil em laranja 'Pera' tratadas com Magnate

500 CE aos 7 dias de armazenamento. O thiabendazole e o tiofanato metílico foram pouco efetivos no controle do bolor verde nas dosagens testadas. Resultados semelhantes foram observados por Nicoli *et al.* (2009), utilizando imazalil e thiabendazole como fungicidas-padrão no controle do bolor verde em laranjas 'Pera Rio'. Os autores constataram que o thiabendazole não controlou a doença, observando que 82,5% dos frutos apresentavam a doença aos oito dias após a inoculação, enquanto a incidência nos frutos pulverizados com o imazalil foi igual a zero.

Até o terceiro dia, os frutos tratados com biomassa cítrica apresentaram baixa incidência (23,8%) em relação àqueles tratados com água (80,9%), água+tween (100%) e óleo de alho, mas esse desempenho não se manteve até o último dia. A partir do quarto, os efeitos dos produtos alternativos igualaram-se estatisticamente.

A biomassa cítrica compreende um extrato obtido de resíduos da indústria de suco, sendo recomendado para uso em campo e pós-colheita em diversas culturas. A formulação contém substâncias que exibem atividade antimicrobiana como polifenóis, flavonoides, fitoalexinas e ácidos orgânicos (Abreu *et al.*, 2008). Tais compostos, sintetizados pelos vegetais, geralmente estão presentes em altas concentrações nos tecidos saudáveis e estão envolvidos na resistência de plantas a fitopatógenos (Pascholati e Leite, 1995). No entanto, para afirmar a ocorrência de resistência, um dos critérios estabelecidos por Sticher *et al.* (1997) é a necessidade de um intervalo de tempo entre a exposição da planta ao indutor e a expressão de resistência. Assim, conforme descrito na metodologia deste trabalho, as tangerinas foram pulverizadas com os produtos alternativos logo após inoculação com o patógeno, não havendo tempo para que o fruto atingisse o estado de indução, pois, segundo Sticher *et al.* (1997), a expressão dos genes ativados não é imediata. Dessa forma, sugere-se que a biomassa cítrica tenha sido efetiva pela atuação direta sobre *P. digitatum*, embora não tenham sido realizados estudos para detectar alterações morfológicas do patógeno.

Tabela 1- Valores médios de incidência¹ (%) do bolor verde em tangerinas ‘Poncã’ inoculadas com *Penicillium digitatum*, tratadas com diferentes produtos alternativos aos agroquímicos e incubadas a 21 ± 1°C e 85-90% de UR por oito dias

Trat ³	Dias após a inoculação ²								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Água	0 a	14,3 a	33,3 a	80,9 b	95,2 a	95,2 a	95,2 a	95,2 a	95,2 a
Ág. + t	0 a	4,8 a	14,3 b	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
Imazalil	0 a	0 a	0 c	0 f	4,7 c	9,5 c	28,6 c	28,6 b	28,6 b
Tiofan.	0 a	0 a	19,0 b	28,6 e	71,4 b	85,7 b	85,7 b	85,7 a	85,7 a
Thiab.	0 a	0 a	0 c	0,0 f	76,2 b	76,2 b	80,9 b	85,7 a	85,7 a
Quitos.	0 a	0 a	0 c	47,6 d	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
Biom.	0 a	0 a	0 c	23,8 e	90,5 a	100 a	100 a	100 a	100 a
Cr. Índia	0 a	0 a	4,8 c	38,1 d	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
Nim	0 a	0 a	0 c	61,9 c	95,2 a	100 a	100 a	100 a	100 a
Pim. Longa	0 a	0 a	4,8 c	47,6 d	90,5 a	90,5 b	100 a	100 a	100 a
Alho	0 a	0 a	19,0 b	95,2 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a

¹Incidência = (nº de frutos colonizados / nº total de frutos) x 100.

²Grupos de médias seguidas de mesmas letras nas colunas não diferem entre si, ao nível de significância de 5%, pelo critério de Scott-Knott.

³Água – água destilada; Ág. + t – água destilada + 8 mL/L de tween 20; Tiofan. – tiofanato metílico; Thiab. – thiabendazole; Quitos. – quitosana 10 mL/L + 8 mL/L de tween 20; Biom. – biomassa cítrica 10 mL/L + 8 mL/L de tween 20; Cr. Índia – cravo-da-Índia 5 mL/L + 8 mL/L de tween 20; Nim – óleo de nim 10 mL/L + 8 mL/L de tween 20; Pim. Longa – óleo de Pimenta Longa 5 mL/L + 8 mL/L de tween 20; Alho – óleo de alho 10 mL/L + 8 mL/L de tween 20.

Apenas no terceiro dia, verificou-se distinção entre os grupos de médias dos produtos alternativos, sendo que a biomassa cítrica se mostrou superior à quitosana, ao óleo de nim, ao cravo-da-índia e à pimenta longa (Tabela 1). Souza *et al.* (2008), avaliando o efeito de diversos extratos e óleos vegetais no controle de *P. digitatum* em limas ácidas ‘Tahiti’ injuriadas e inoculadas, constataram que o óleo de nim a 0,1% não diferiu da testemunha quanto à incidência, não sendo eficaz em reduzir a doença.

Carvalho *et al.* (2009) também observaram que o cravo-da-índia na concentração de 0,01% usado no tratamento pós-colheita de frutos de pêssego não reduziu a incidência de podridão parda causada por *Monilinia fructicola*. No entanto, nesse mesmo estudo, o cravo-da-índia reduziu a incidência de *Rhizopus* spp. até nove dias de armazenamento. Tais observações demonstram a necessidade do estudo desses produtos alternativos para cada patossistema, visto que não se pode generalizar o efeito para diferentes doenças e hospedeiros.

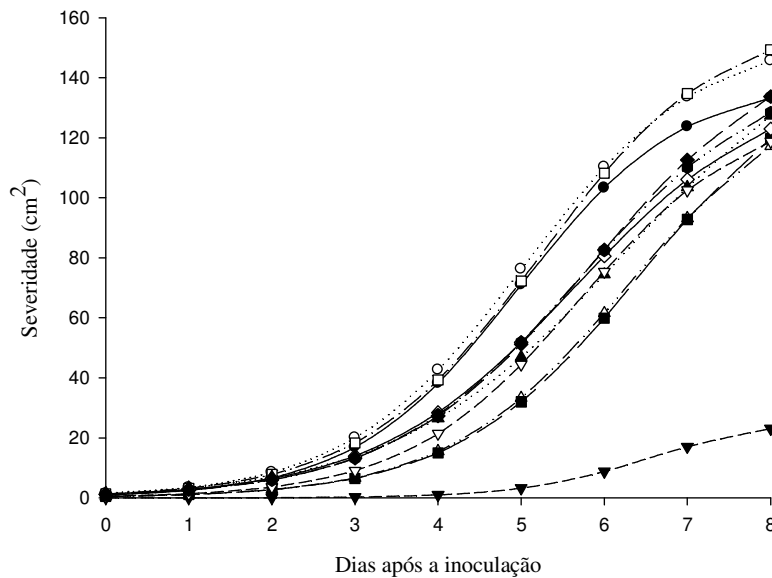
3.2. Severidade

As médias de severidade da doença ajustaram-se ao modelo sigmoidal em função dos dias de avaliação para todos os produtos testados (Figura 3). Os frutos apresentaram valores crescentes de severidade, sendo que os tratados com água, água + tween e óleo de alho exibiram maior área colonizada pelo patógeno. Embora com valores crescentes, as tangerinas pulverizadas com imazalil apresentaram baixa severidade, com médias inferiores às de todos os outros tratamentos, seguidas daquelas tratadas com tiofanato metílico e thiabendazole.

Somente a partir do quarto dia foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos (Tabela 2). A biomassa cítrica foi eficiente em conter a colonização do patógeno até o quarto dia. Nesse dia, observou-se redução da área colonizada em 44% em comparação com a testemunha água, igualando-se estatisticamente aos valores encontrados nos tratamentos com thiabendazole e tiofanato metílico, que reduziram a área colonizada pelo fungo em 59,4 e 60,9%, respectivamente, em relação à água (Figura 3).

Por outro lado, as médias das áreas colonizadas nos frutos tratados com óleo de alho, testemunha e água+tween posicionaram-se em um mesmo grupo (Tabela 2), confirmando os resultados obtidos por Araújo *et al.* (2009). Os autores observaram aumento do crescimento micelial de *P. roqueforti* em testes *in vitro* e um efeito não inibitório do extrato aquoso de alho, indicando que o alho promove o crescimento do fungo, talvez, em decorrência dos seus componentes nutricionais. Souza *et al.* (2007) verificaram que o extrato de alho na concentração de 0,5% promoveu aumento no crescimento micelial de *Fusarium proliferatum*, agente causal de podridões em sementes de milho. Tais resultados estão de acordo com os obtidos no presente trabalho.

—●—	Água destilada	$\hat{Y} = 139,45879 / (1 + \exp(5,02114 - 1,01160 ** D))$	$R^2 = 0,989$
.....○.....	Água destilada + tween	$\hat{Y} = 154,67649 / (1 + \exp(4,71961 - 0,93802 ** D))$	$R^2 = 0,999$
- - -▼- - -	Imazalil	$\hat{Y} = 26,77030 / (1 + \exp(8,35821 - 1,27378 ** D))$	$R^2 = 0,997$
- - -△- - -	Thiabendazole	$\hat{Y} = 141,63099 / (1 + \exp(5,76207 - 0,91649 ** D))$	$R^2 = 0,994$
—■—	Tiofanato Metílico	$\hat{Y} = 149,37990 / (1 + \exp(5,78425 - 0,89699 ** D))$	$R^2 = 0,996$
- - -□- - -	Óleo de Alho 1%	$\hat{Y} = 160,67364 / (1 + \exp(4,82705 - 0,92491 ** D))$	$R^2 = 0,984$
- - -◆- - -	Cravo-da-Índia 0,5%	$\hat{Y} = 156,25192 / (1 + \exp(4,88221 - 0,83291 ** D))$	$R^2 = 0,991$
—◇—	Óleo de nim 1%	$\hat{Y} = 140,05522 / (1 + \exp(4,70730 - 0,83508 ** D))$	$R^2 = 0,985$
.....▲.....	Óleo de pimenta longa 0,5%	$\hat{Y} = 161,62839 / (1 + \exp(4,57252 - 0,73578 ** D))$	$R^2 = 0,984$
- - -▽- - -	Biomassa cítrica 1%	$\hat{Y} = 131,52329 / (1 + \exp(5,50434 - 0,96641 ** D))$	$R^2 = 0,993$
- - -●- - -	Quitossana 1%	$\hat{Y} = 146,40457 / (1 + \exp(4,87720 - 0,85532 ** D))$	$R^2 = 0,987$



** Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste 't' de Student

Figura 3 – Estimativa da severidade (cm^2) do bolor verde em tangerinas 'Poncã' inoculadas com *Penicillium digitatum*, tratadas com diferentes fungicidas e produtos alternativos aos agroquímicos e incubadas a $21 \pm 1^\circ\text{C}$ e 85-90% de UR por oito dias (D).

Após o quarto dia, apenas os fungicidas se destacaram no controle da doença (Tabela 2), sendo o imazalil o que propiciou maior controle, reduzindo a severidade em 89% em relação à água no último dia de avaliação, enquanto thiabendazole e tiofanato metílico propiciaram controle de 12% e 10%, respectivamente (Figura 3). Em vários trabalhos com objetivo de testar a eficiência de produtos alternativos em frutos cítricos, o imazalil tem sido utilizado como fungicida padrão, controlando totalmente o bolor verde (Franco & Bettioli, 2000). No presente trabalho, o thiabendazole não foi efetivo no controle da doença, sendo este resultado diferente de outros encontrados na literatura.

Esse fungicida promoveu o controle de 100% da doença, em trabalho realizado por Franco & Bettiol (2002).

Embora não haja condição de afirmar sobre a ocorrência de resistência neste trabalho, vários casos de resistência a fungicidas têm sido relatados na literatura. Segundo Zambolim (2008), o maior número de casos de resistência verificados na literatura se refere ao grupo dos benzimidazóis. Isolados de *P. digitatum*, coletados de frutos deteriorados de tangerinas (*Citrus reticulata*), laranjas (*C. sinensis*), limões (*C. limon*) e toranjas (*C. paradisi*) em supermercados de Paris e Rotterdam, mostraram-se resistentes ao thiabendazole (Bus *et al.*, 1991). A resistência de *P. digitatum* ao thiabendazole também foi relatada na Califórnia, onde se observou que isolados do fungo foram resistentes aos fungicidas imazalil, tiabendazol e o-phenylphenol. Entre os 326 isolados coletados, a percentagem de isolados resistentes aumentou de 43% em 1988 para 77% em 1990 (Holmes & Eckert 1999). Além disso, o sinergismo entre isolados suscetíveis e resistentes do patógeno dificulta o efeito dos produtos, como constatado com fungicida do grupo benzimidazol (Wild & Eckert, 1982). Esses resultados demonstram a importância da descoberta de moléculas bioativas para o controle de fitopatógenos. Embora os fungicidas reduzam a doença, esse efeito pode não ser duradouro e o patógeno-alvo pode perder a sensibilidade ao princípio ativo.

A partir do quinto dia após a inoculação, a biomassa cítrica não foi capaz de conter o crescimento do patógeno, igualando-se aos demais produtos alternativos, com exceção do óleo de alho, formando um único grupo (Tabela 2). Benato *et al.* (2002) relataram que a biomassa cítrica diferiu significativamente da testemunha, mas não foi eficiente em controlar podridões pós-colheita em maracujá-amarelo até o final do período avaliado, que foi de dez dias. A razão de a biomassa cítrica, que se mostrou o produto alternativo mais promissor, controlar a doença até certo período de tempo, pode ser atribuída ao fato de os teores e a composição química dos constituintes voláteis das plantas sofrerem influência de diversos fatores (Costa *et al.*, 2005) e isso comprometer a qualidade dos princípios ativos, que podem ter seu efeito reduzido ao longo do tempo, reduzindo também o potencial de inibição do patógeno.

Tabela 2 – Valores médios de severidade¹ (cm²) do bolor verde em tangerinas ‘Poncã’ inoculadas com *Penicillium digitatum*, tratadas com diferentes fungicidas e produtos alternativos aos agroquímicos e incubadas a 21 ± 1°C e 85-90% de UR por oito dias

Trat ³	Dias após a inoculação ²								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Água	0,0 a	0,5 a	1,2 a	13,5 a	49,3 a	63,4 a	102,7 a	129,3 a	130,1 b
Ág. + t	0,0 a	0,2 a	0,4 a	15,7 a	55,7 a	70,8 a	107,0 a	136,8 a	145,2 a
Imazalil	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	1,2 d	2,4 d	9,6 d	16,5 c	23,3 c
Tiofan.	0,0 a	0,0 a	0,6 a	1,4 a	16,7 c	31,9 c	63,9 c	87,9 b	121,6 b
Thiab.	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	21,1 c	35,1 c	58,2 c	94,7 b	116,9 b
Quitos.	0,0 a	0,0 a	0,0 a	4,0 a	37,4 b	52,5 b	83,2 b	103,7 b	132,4 b
Biom.	0,0 a	0,0 a	0,0 a	2,0 a	28,1 c	43,2 b	76,9 b	98,7 b	120,9 b
Cr. Índia	0,0 a	0,0 a	0,1 a	6,0 a	37,7 b	50,4 b	81,7 b	110,4 b	135,5a
Nim	0,0 a	0,0 a	0,0 a	4,8 a	39,3 b	52,6 b	80,1 b	100,1 b	127,0 b
Pim. Longa	0,0 a	0,0 a	0,1 a	5,6 a	37,4 b	43,2 b	76,0 b	96,5 b	131,0 b
Alho	0,0 a	0,0 a	0,4 a	14,3 a	54,5 a	63,0 a	105,5 a	142,5 a	145,5 a

¹Médias da área das lesões, descontando-se a área do ferimento inicial.

²Grupos de médias seguidas de mesmas letras nas colunas não diferem entre si, ao nível de significância de 5%, pelo critério de Scott-Knott.

³Água – água destilada; Ág. + t – água destilada + 8 mL/L de tween 20; Tiofan. – tiofanato metílico; Thiab. – thiabendazole; Quitos. – quitosana 10 mL/L + 8 mL/L de tween 20; Biom. – biomassa cítrica 10 mL/L + 8 mL/L de tween 20; Cr. Índia – cravo-da-Índia 5 mL/L + 8 mL/L de tween 20; Nim – óleo de nim 10 mL/L + 8 mL/L de tween 20; Pim. Longa – óleo de Pimenta Longa 5 mL/L + 8 mL/L de tween 20; Alho – óleo de alho 10 mL/L + 8 mL/L de tween 20.

No oitavo dia após a inoculação, os frutos pulverizados com água, água destilada+tween e óleo de alho, apresentavam-se, em sua maior parte, infestados pelo patógeno, enquanto as tangerinas tratadas com imazalil exibiam superfície praticamente com ausência de crescimento fúngico (Figura 4).



Figura 4 – Infestação de *P. digitatum* em tangerinas Poncã aos 8 dias após a inoculação.

Embora os outros produtos como a quitosana, óleo de nim, pimenta longa e cravo-da-índia tenham formado grupos de médias distintos da testemunha, não foram efetivos no controle do bolor verde. Souza *et al.* (2004), avaliando o efeito de óleos essenciais de condimentos sobre o desenvolvimento micelial de fungos associados a produtos de panificação, verificaram que óleo essencial de cravo não foi eficiente em inibir o desenvolvimento micelial de *Penicillium* spp. Em testes em condições de campo, utilizando produtos alternativos para controle da requeima do tomateiro causada por *Phytophthora infestans*, os extratos de plantas avaliados - cravo, açafreão-da-índia, pimenta, pimenta-do-reino e alho - foram pouco eficientes em reduzir a intensidade da doença. A baixa eficiência das misturas destes extratos indica insensibilidade do patógeno aos compostos ou a baixas concentrações dos seus princípios ativos (Diniz *et al.*, 2006).

3.3. Período de incubação e período latente

Os produtos alternativos, com exceção do óleo de alho, constituíram um mesmo grupo de médias, tanto para período de incubação quanto para período latente, cujos valores foram estatisticamente maiores que os do grupo formado pelos frutos tratados com água e água + tween, indicando capacidade em atrasar o aparecimento da doença. Observam-se, dentre os fungicidas utilizados, diferenças significativas quanto ao período de incubação, sendo o destaque para os frutos tratados com imazalil, cujo período de incubação se estendeu para 7,28 dias e o latente para 7,95 dias (Tabela 3).

A biomassa cítrica foi eficiente em atrasar o aparecimento da doença, sendo superior aos demais produtos alternativos e situando-se no mesmo grupo de médias dos frutos tratados com tiofanato metílico. Quanto ao período latente, o grupo de médias dos produtos alternativos, excetuando-se o óleo de alho, diferiu da testemunha água, sugerindo efeito inibitório de seus princípios ativos sobre as estruturas do patógeno (Tabela 3).

A eficiência da biomassa cítrica também foi verificada por Hanada *et al.* (2004) na erradicação de conídios de *Mycosphaerella fijiensis* aderidos à superfície de bananas, que atuam na disseminação da doença. Os autores verificaram que o Ecolife®, produto de origem natural, composto de bioflavonoides cítricos, fitoalexinas cítricas e ácido ascórbico, semelhante à biomassa cítrica, foi eficiente em inibir em 100% a germinação, igualando-se aos fungicidas thiabendazole e benomil, independentemente do modo de aplicação, ou seja, por imersão ou pulverização. Nesse mesmo estudo, os autores constataram também a falta de efetividade do óleo de pimenta longa em inibir totalmente a germinação de conídios.

Tabela 3- Período de incubação e período latente médio de *Penicillium digitatum* em tangerinas ‘Poncã’ tratadas com diferentes produtos alternativos aos agroquímicos e incubadas a $21 \pm 1^\circ\text{C}$ e 85-90% de UR por oito dias

Tratamentos ¹	Período de incubação ² (dias)	Período latente ² (dias)
Água	2,90 e	3,43 d
Água + tween	2,81 e	3,00 d
Imazalil	7,28 a	7,95 a
Tiofanato	4,24 c	5,48 b
Thiabendaz.	4,81 b	5,09 b
Quitosana	3,52 d	3,86 c
Biomassa	3,86 c	4,05 c
Cr. Índia	3,43 d	3,95 c
Nim	3,43 d	3,76 c
Pim. Longa	3,67 d	3,86 c
Alho	2,86 e	3,09 d

¹Água – água destilada; Água + t – água destilada + 8 mL/L de tween 20; Tiofanato – tiofanato metílico; Thiabendaz. – thiabendazole; Quitosana – quitosana 10 mL/L + 8 mL/L de tween 20; Biomassa – biomassa cítrica 10 mL/L + 8 mL/L de tween 20; Cr. Índia – cravo-da-Índia 5 mL/L + 8 mL/L de tween 20; Nim – óleo de nim 10 mL/L + 8 mL/L de tween 20; Pim. Longa – óleo de Pimenta Longa 5 mL/L + 8 mL/L de tween 20; Alho – óleo de alho 10 mL/L + 8 mL/L de tween 20.

²Grupos de médias seguidas de mesmas letras nas colunas não diferem entre si, ao nível de significância de 5%, pelo critério de Scott-Knott.

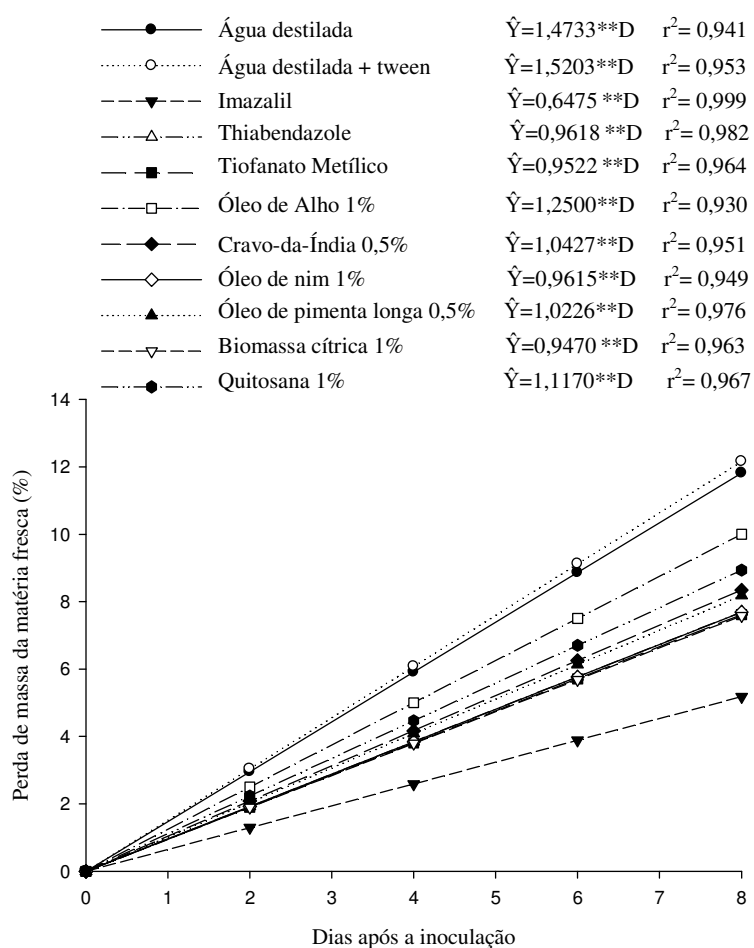
Zhang & Quantick (1997) relataram que a quitosana nem sempre é tão ou mais efetiva que os fungicidas sintéticos, como em lichias, em que o produto atrasou o processo de infecção durante 33 dias de armazenamento, mas não foi tão efetivo quanto o thiabendazole no controle de podridões.

A extensão do período de incubação é de grande interesse, pois implica prolongamento da vida útil pós-colheita dos frutos, enquanto a extensão do período latente contribuirá para a redução do inóculo secundário, que constitui o inóculo inicialmente produzido sobre o fruto, o qual contribuirá para o ciclo seguinte da doença. *Penicillium digitatum* possui alta capacidade de esporulação (Santos e Matos, 2006) e quanto maior for o tempo para o aparecimento de estruturas do patógeno, menores as chances de um fruto colonizado contaminar um fruto sadio. No armazenamento a granel, os frutos sadios podem ser depreciados e permanecer manchados com os

esporos liberados pelos frutos doentes. Frutos colonizados possuem período de armazenamento reduzido devido à síntese de etileno, que acelera a maturação do fruto, diminuindo sua vida de prateleira (Laranjeira *et al.* 2002).

3.4. Perda de massa da matéria fresca

As médias de perda de massa da matéria fresca ajustaram-se a um modelo linear crescente em função dos dias de avaliação (D), para todos os produtos (Figura 5).



** Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste 't' de Student

Figura 5 – Estimativa da perda de massa da matéria fresca em tangerinas 'Poncã' inoculadas com *Penicillium digitatum*, tratadas com diferentes fungicidas e produtos alternativos aos agroquímicos e incubadas a $21 \pm 1^\circ\text{C}$ e 85-90% de UR por oito dias (D).

Os maiores valores de perda de massa da matéria fresca foram observados nos frutos tratados com água e água+tween, com 11,8% e 12,2 %, no oitavo dia, respectivamente (Figura 5). A partir de outros dados como a severidade e incidência, nota-se que, nestes tratamentos, o progresso da doença foi mais rápido, e a deterioração resultou em maior perda de massa da matéria fresca. Verifica-se que existe uma correlação positiva entre severidade e perda de massa (0,66**). Assim, quanto maior a severidade, maior será a perda de massa. Sabe-se que fungos do gênero *Penicillium* apresentam complexos enzimáticos capazes de degradar eficientemente a celulose (Martins, 2005) e, portanto, a maior severidade decorrente da infecção pelo patógeno implica degradação da parede celular. A camada externa que recobre o fruto, a cutícula, é rompida em função do ataque do fungo, e sua perda de integridade resulta em diminuição na coesão das células, perda de firmeza dos tecidos e maior exposição dos tecidos ao ambiente.

Ao avaliar os efeitos dos tratamentos dentro dos dias pelo critério de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade, é possível observar que somente a partir do quarto dia as médias dos tratamentos diferiram entre si (Tabela 4). Observa-se que os frutos tratados com água e água + tween formaram um grupo à parte dos demais, indicando que o progresso da doença foi mais rápido nestes frutos e que a deterioração resultou em maior perda de matéria fresca.

No sexto dia após a inoculação, as tangerinas pulverizadas com imazalil apresentaram menor perda de matéria fresca, com valor ainda aceitável para comercialização, diferentemente dos valores observados para todos os outros tratamentos, cujas médias foram superiores a 5%. Segundo Chitarra e Chitarra (2005), perdas de umidade da ordem de 3 a 5% tornam, muitas vezes, o produto impróprio para a comercialização devido ao início do processo de murchamento ou enrugamento, não aceitável pelo consumidor. A baixa perda de massa nos frutos tratados com imazalil pode ser atribuída à manutenção da integridade dos tecidos.

Embora apresentassem elevadas taxas de perda de matéria fresca, as tangerinas tratadas com tiofanato metílico, thiabendazole, quitosana, biomassa cítrica, cravo-da-índia, óleo de nim e pimenta longa formaram um grupo estatisticamente distinto daquelas tratadas com água, água + tween e óleo de alho. Dentre tais produtos, a quitosana vem sendo amplamente estudada com objetivo de não somente controlar doenças, mas também de contribuir para a manutenção da qualidade pós-colheita de

produtos perecíveis. É possível que a quitosana tenha formado uma barreira diminuindo o déficit de pressão do vapor d'água dos frutos em relação ao ambiente.

Tabela 4 – Valores médios de perda de massa da matéria fresca¹ (PMMF) de tangerinas ‘Poncã’ inoculadas com *Penicillium digitatum*, tratadas com diferentes produtos alternativos aos agroquímicos e incubadas a 21 ± 1°C e 85-90% de UR

Tratamentos ³	Dias após a inoculação ²			
	0	2	4	6
Água	0 a	1,39 a	4,28 a	10,47 a
Água + t	0 a	1,68 a	4,54 a	10,60 a
Imazalil	0 a	1,26 a	2,67 b	3,84 d
Tiofanato	0 a	1,28 a	2,89 b	6,53 c
Thiabendaz.	0 a	1,46 a	3,22 b	6,34 c
Quitosana	0 a	1,49 a	3,48 b	7,61 c
Biomassa	0 a	1,26 a	2,87 b	6,51 c
Cr. Índia	0 a	1,13 a	3,11 b	7,28 c
Nim	0 a	1,06 a	2,81 b	6,74 c
Pim. Longa	0 a	1,40 a	3,37 b	6,83 c
Alho	0 a	1,05 a	3,48 b	8,99 b

¹ % PMMF = (peso inicial – peso final) * 100 / peso inicial

² Grupos de médias seguidas de mesmas letras nas colunas não diferem entre si, ao nível de significância de 5%, pelo critério de Scott-Knott.

³ Água – água destilada; Água + t – água destilada + 8 mL/L de tween 20; Tiofanato – tiofanato metílico; Thiabendaz. – thiabendazole; Quitosana – quitosana 10 mL/L + 8 mL/L de tween 20; Biomassa – biomassa cítrica 10 mL/L + 8 mL/L de tween 20; Cr. Índia – cravo-da-Índia 5 mL/L + 8 mL/L de tween 20; Nim – óleo de nim 10 mL/L + 8 mL/L de tween 20; Pim. Longa – óleo de Pimenta Longa 5 mL/L + 8 mL/L de tween 20; Alho – óleo de alho 10 mL/L + 8 mL/L de tween 20.

Zhang & Quantick (1997) descreveram a habilidade deste polissacarídeo em formar um filme semipermeável que pode modificar a atmosfera e diminuir a transpiração dos frutos. Devido à sua propriedade “filmogênica”, a quitosana pode atuar como uma barreira à saída de nutrientes e, conseqüentemente, reduzir sua disponibilidade a um nível que não sustentaria o crescimento do patógeno (Cia *et al.*, 2007). Partindo desse pressuposto, frutos mais atacados apresentam menor integridade do tecido e, assim, maior disponibilidade de nutrientes para o crescimento de *P.*

digitatum. Logo, a formação de uma película nos frutos impede a perda de água e a consequente alteração da textura e o ataque de patógenos.

3.5. Produção de CO₂

Os frutos, até o terceiro dia, apresentaram taxas respiratórias semelhantes. A partir de então, observa-se ascensão na produção de CO₂, com exceção do imazalil e óleo de pimenta longa, que mantiveram a taxa respiratória aproximadamente constante (Figura 6). Nesse período, em que a superfície do fruto colonizada pelo patógeno era incipiente (Figura 3), os valores médios encontrados são compatíveis com aqueles relatados por Biale (1960), de 16,1 e 21,5 mg CO₂.kg⁻¹.h⁻¹ para limão e laranja, respectivamente, a 20 °C.

Os frutos tratados com água, água+tween e óleo de alho apresentaram taxas respiratórias maiores em relação aos dos demais tratamentos do terceiro ao sexto dia de avaliação (Figura 6). Estes tratamentos foram os que exibiram maior severidade e incidência de bolor verde. A destruição da cutícula diminui a resistência à difusão do O₂, CO₂ e do vapor d'água entre o interior dos tecidos e o meio externo circundante, favorecendo o aumento da respiração. Verifica-se correlação positiva (0,40**) entre a respiração e a perda de massa, ou seja, o aumento da respiração resultará em maior perda de massa da matéria fresca uma vez que os compostos de carbono são consumidos no processo respiratório. Segundo Chitarra & Chitarra (2005), a extensão do aumento na taxa de respiração é usualmente proporcional à severidade do dano que pode ser de origem mecânica ou causada por infecção de microrganismos. Observações semelhantes foram constatadas nesse trabalho, em que o aumento da respiração coincide com o aumento da severidade (Figura 3) e da incidência (Figura 2) e, conseqüentemente, com maiores danos nos tecidos. A partir do sexto dia de avaliação, a redução na taxa respiratória possivelmente pode ser atribuída à morte dos tecidos de grande parte dos frutos (Figura 4).

Os frutos tratados com quitosana e biomassa cítrica apresentaram médias crescentes de produção de CO₂ até o fim do período avaliado. Mazaró *et al.* (2008) observaram elevação da taxa respiratória em morangos tratados com quitosana a 2% em comparação com as doses de 0,5 e 1% e atribuíram esse resultado ao fato de, naquela concentração, os frutos terem apresentado danos que resultaram no aumento do metabolismo e, conseqüentemente, no aumento da taxa respiratória (Moraes, 2005).

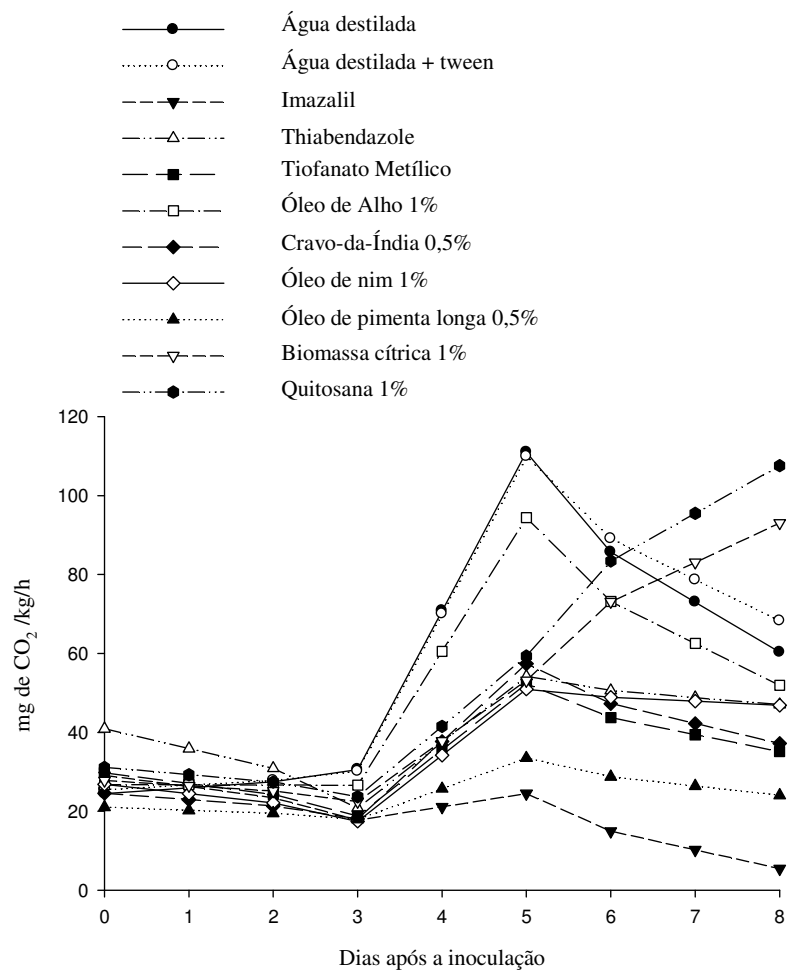


Figura 6 – Taxa respiratória (mg de CO₂/kg/h) de tangerinas ‘Poncã’ tratadas com fungicidas e produtos alternativos.

Outros fatores contribuíram para o aumento da taxa respiratória, como a injúria causada no fruto pelo tubo preenchido por agulhas, além do etileno produzido pelo próprio patógeno, uma vez que *P. digitatum* produz grande quantidade de etileno (Fukuda & Ogawa, 1991).

4. CONCLUSÕES

- Dentre os produtos alternativos testados, biomassa cítrica foi o que se mostrou mais promissor no controle do bolor verde em tangerinas 'Poncã', enquanto o óleo de alho foi o menos promissor;

- O destaque foi para o imazalil que propiciou o maior controle do bolor verde.

CAPÍTULO 2

CONTROLE DO BOLOR VERDE EM LARANJAS 'VALÊNCIA' COM PRODUTOS ALTERNATIVOS AOS AGROQUÍMICOS

RESUMO

A principal doença de laranjas após a colheita é o bolor verde, causado por *Penicillium digitatum*. Este patógeno e o resíduo de fungicidas constituem grande problema para a expansão do agronegócio de frutos cítricos *in natura*. Neste trabalho foi avaliado o efeito de produtos alternativos comparados aos agroquímicos no controle do bolor verde em pós-colheita de laranja 'Valência'. Frutos no estágio fisiológico maduro, com $60,0 \pm 0,3$ % p/p de suco e $11,5 \pm 0,2$ °Brix e massa média de $165,4 \pm 4,0$ g foram lavados, desinfestados e inoculados com 50 µL de uma suspensão de conídios de *P. digitatum* a uma concentração de 1×10^6 conídios/mL sobre um ferimento de cerca de 1 mm de profundidade e 9 mm de diâmetro na região equatorial do fruto. Após a secagem da suspensão de inóculo, os frutos foram pulverizados até o molhamento completo com água destilada, água destilada + 8 mL/L de tween 20, imazalil (200 mL de Maginate® 500 EC/100 L de água), thiabendazole (103 mL de Tecto® SC/100 L de água), tiofanato metílico (70 g de Cercobin® 700 WP/100 L de água), quitosana 10 mL/L de água ou óleos essenciais de alho 10 mL/L de água, cravo-da-índia 5 mL/L de água, nim 10 mL/L de água, pimenta longa 5 mL/L de água e biomassa cítrica 10 mL/L de água. Os óleos essenciais e a quitosana foram acrescidos de 8 mL/L de tween 20.

Os frutos foram acondicionados, em grupos de três, em bandejas de poliestireno expandido e armazenados em câmara a 21 ± 1 °C e 85-90% UR, onde permaneceram por sete dias. Avaliaram-se o período de incubação e o período latente do fungo e, diariamente, a severidade e a incidência da doença. A perda de matéria fresca e a produção de CO₂ foram também avaliadas a cada dois dias. Biomassa cítrica e quitosana mostraram-se os mais promissores no controle do bolor verde, estendendo o período de incubação em 2,8 dias e o período latente em aproximadamente 3,3 dias em relação à água, além de reduzir a severidade da doença em 59,6% e 62%, respectivamente, também em comparação com a água, no sétimo dia após a inoculação. Biomassa cítrica e quitosana foram eficientes ainda em reduzir a incidência em 26,3% e 32,6%, respectivamente, aos 5 dias, em relação à água. O imazalil e o tiofanato metílico controlaram a doença em 100% até o sétimo dia de avaliação. Dentre os produtos alternativos, a biomassa cítrica propiciou a menor perda de massa, estando no mesmo grupo de médias dos fungicidas. Quanto à produção de CO₂, verifica-se menor taxa respiratória nos frutos tratados com fungicidas, enquanto biomassa cítrica, em comparação com os outros produtos alternativos, exibiu produção inferior de CO₂.

1. INTRODUÇÃO

A citricultura exerce importante papel no desenvolvimento do Brasil, seja pela injeção de recursos na economia, pela grande absorção de mão de obra que contribui para a fixação do homem no campo, e por propiciar posição de destaque internacional ao país, já que o Brasil é o maior produtor de citros e o maior exportador de suco de laranja.

Em 2008, a produção brasileira de laranjas atingiu aproximadamente 16.800.000 t numa área plantada superior a 821 mil hectares (Agrianual, 2009), estando localizado em São Paulo o maior parque citrícola mundial, embora na maioria dos estados brasileiros se cultivem frutas cítricas.

O foco comercial da cadeia paulista é a produção/comercialização industrial da laranja, sendo que 70 a 80% da produção se destinam à industrialização, entre 20 e 30% são comercializados no mercado interno e menos de 1% é exportado *in natura* (Boteon & Neves, 2005). Esta baixa relação entre produção e exportação se deve às variedades cultivadas, mais apropriadas ao processamento e distanciadas de gostos e preferências dos consumidores estrangeiros e às barreiras tarifárias e restrições sanitárias, destacando-se a exigência de qualidade pelo mercado externo, como frutas bem selecionadas, embaladas adequadamente, certificadas e sistema de rastreabilidade (Toffano, 2005).

Como importante problema sanitário de laranjas na pós-colheita, destaca-se o bolor verde causado por *Penicillium digitatum*, que provoca rápida desintegração dos tecidos, exalando odor característico e tornando o fruto inapto para consumo humano.

Várias medidas de controle são recomendadas para essa doença, mas o tratamento químico é o método mais utilizado, sendo recomendados, no Brasil, os fungicidas do grupo benzimidazol e imidazol (AGROFIT, 2009). Embora esses fungicidas sejam amplamente utilizados devido à sua alta capacidade sistêmica contra grande número de patógenos, possuem várias restrições de uso, dentre elas selecionar isolados resistentes em função do seu uso contínuo.

A ênfase em proteção de frutos pós-colheita contra podridões tem sido desviada do uso de produtos químicos para várias técnicas alternativas de controle, que garantam a segurança do produto e que não coloquem em risco a saúde dos consumidores, minimizando ou substituindo o uso de fungicidas e prolongando o período de conservação dos frutos (Camili *et al.*, 2007).

Há relatos da eficiência de extratos e óleos vegetais no controle de fitopatógenos. Assim, Toffano (2005), avaliando o potencial de extratos do albedo de laranja, flavedo de limão ‘Tahiti’, *Lentinula edodes*, *Agaricus blazei* e ácido jasmônico como possíveis agentes de controle de *P. digitatum* e de indução de resistência em frutos de laranja ‘Valência’, observou que o flavedo de limão ‘Tahiti’ reduziu o número de frutos doentes e o número de frutos com esporulação do patógeno. Franco & Bettioli (2000) verificando a eficiência de produtos alternativos como extratos vegetais em laranja ‘Pera’ inoculadas com *P. digitatum*, obtiveram resultados promissores, observando que apenas 20% dos frutos tratados com *Cymbopogon citratus* a 5% foram infectados com a doença, enquanto a infecção ocorreu em 90% dos frutos do tratamento testemunha.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de quitosana, biomassa cítrica e óleos de nim, pimenta longa, alho e cravo-da-índia no controle do bolor verde em laranja ‘Valência’ e comparar seus efeitos com os de agroquímicos registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para o controle dessa doença.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Frutos de laranja ‘Valência’ [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] foram colhidas no Pomar Experimental da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, em 24 de agosto de 2009. De acordo com os critérios mínimos para colheita de laranja ‘Valência’ estabelecidos pelo Programa Brasileiro para a Melhoria dos Padrões Comerciais e Embalagens de Hortigranjeiros (2000), que recomenda 44% p/p de suco e 10 °brix, os frutos foram colhidos no estágio fisiológico maduro com $60,0 \pm 0,3$ % p/p de suco e $11,5 \pm 0,2$ ° Brix. Em seguida, foram transportados até o Galpão de Pós-Colheita do Setor de Fruticultura do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa em caixas forradas com plástico-bolha e em camadas únicas para evitar qualquer ferimento. Foi feita a seleção de acordo com ausência de injúrias, uniformidade de cor e tamanho, utilizando-se frutos com massa de $165,4 \pm 4,0$ g. As laranjas foram lavadas com detergente neutro 2 mL/L e enxaguadas duas vezes em água potável. Posteriormente, foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio a 0,5% (v/v) durante três minutos, novamente enxaguadas em água potável por duas vezes e colocadas para secar ao ar.

Após esse processo, os frutos foram feridos em um ponto na região equatorial, a uma profundidade de cerca de 1 mm, com um tubo de aço de 9 mm de diâmetro, tendo seu interior preenchido com agulhas de aço. Após os ferimentos, as laranjas ‘Valência’ foram inoculadas com 50µL de uma suspensão de conídios de *P. digitatum* com $1,0 \times 10^6$ conídios/mL, ajustada com hemacitômetro. O inóculo utilizado foi o mesmo do Capítulo 1, isolado de frutos colonizados no campo pelo processo direto e cultivado

previamente em placas de Petri contendo meio batata, dextrose e ágar por sete a dez dias a 25 °C em câmara de crescimento no Laboratório de Patologia de Sementes e de Pós-colheita do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa. Uma vez secada a suspensão de inóculo, os frutos foram pulverizados com um dos seguintes produtos até o total molhamento, com auxílio de um borrifador:

- água destilada
- água destilada + 8 mL/L Tween 20
- thiabendazole (103 mL de Tecto® SC /100L de água)
- tiofanato metílico (70 g de Cercobin® 700 WP /100L de água)
- imazalil (200 mL de Magnate® 500 EC /100L de água)
- óleo de alho 'Probinatu®' (10 mL/L) + 8 mL/L Tween 20
- óleo essencial de cravo-da-Índia (5 mL/L) + 8 mL/L Tween 20
- óleo de nim 'Organic Neem®' (10 mL/L) + 8 mL/L Tween 20
- óleo essencial de pimenta longa (5 mL/L) + 8 mL/L Tween 20
- biomassa cítrica 'Biogermex' (10 mL/L) + 8 mL/L Tween 20
- quitosana (10 g/L) + 8 mL/L Tween 20

Os óleos essenciais e demais produtos alternativos adquiridos na sua forma concentrada foram diluídos em água para a concentração desejada e acrescidos do emulsificante Tween® 20 (monoleato de sorbitano polioxietileno), um surfactante não-iônico, na concentração de 8 mL/L. No preparo da solução de quitosana, procedeu-se ao ajuste do pH em torno de 4,3 com adição de ácido acético glacial. Em seguida, as laranjas foram acondicionadas em bandejas de poliestireno expandido e armazenadas em câmara a $21 \pm 1^\circ\text{C}$ e 85-90% de UR, onde permaneceram por sete dias. Diariamente foram feitas avaliações para acompanhar a incidência e a severidade da doença e detectar o período de incubação e o período latente do fungo. Foram realizadas também medições da produção de CO₂ e perda de massa da matéria fresca. As metodologias de análises foram semelhantes às descritas no Capítulo 1.

O experimento foi conduzido em parcelas subdivididas no tempo, tendo-se nas parcelas os produtos testados e nas subparcelas, os dias de avaliações (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7). O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com sete repetições e cada unidade experimental constituída de três frutos. Os dados foram submetidos primeiramente às pressuposições da ANOVA, em que foram verificados quanto à normalidade e homogeneidade de variância ao nível de 5% de probabilidade.

Posteriormente, foram analisados por meio das análises de variância e regressão. O modelo ajustado por meio de regressão nas avaliações de perda de massa da matéria fresca foi escolhido com base na significância do coeficiente de regressão no nível de 5% de probabilidade, pelo teste “t” de Student, no coeficiente de determinação e no potencial para explicar o fenômeno biológico. Nos modelos ajustados com regressão não-linear, a escolha foi realizada com base nos dois últimos itens. Os dados foram analisados com auxílio do Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas da Universidade Federal de Viçosa (SAEG, 2007). Para a análise de produção de CO₂, a estatística foi descritiva.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Incidência

O modelo ajustado para a incidência em função dos dias após a inoculação foi o sigmoidal (Figura 1).

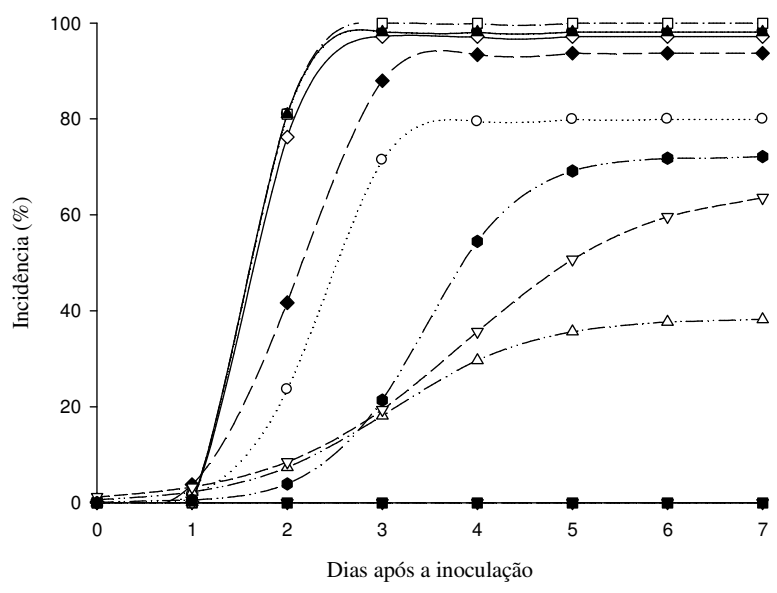
Observa-se uma rápida ascensão da porcentagem de frutos colonizados tratados com água (testemunha), óleos de nim, pimenta longa e alho no segundo dia após a inoculação. Frutos tratados com cravo-da-índia e água+tween apresentaram valores máximos no terceiro dia, enquanto nos frutos tratados com thiabendazole, quitosana e biomassa cítrica, a incidência aumentou de forma mais gradual, atingindo o máximo entre o quinto e o sexto dia após a inoculação. Até o terceiro dia, o thiabendazole, biomassa cítrica e quitosana apresentaram a mesma tendência e, a partir de então, foi observada uma separação das linhas, sendo a porcentagem de frutos colonizados maior no tratamento com quitosana, seguido da biomassa cítrica e, por último, do thiabendazole (Figura 1).

A ineficiência do óleo de pimenta longa em controlar o bolor verde neste trabalho está em desacordo com vários autores que relatam o sucesso desse produto no controle de fitopatógenos. A atividade fungitóxica de óleos essenciais extraídos de diversas plantas pertencentes ao gênero *Piper* tem sido relatada em diversos trabalhos,

como os de Bastos e Albuquerque (2004) e Bastos (1997), que demonstram a ação inibitória do óleo essencial de *Piper aduncum* L. contra *Colletotrichum musae* e *Crinipellis pernicioso*, respectivamente, juntamente com a inibição *in vitro* do crescimento micelial de vários outros fitopatógenos. No entanto, a maioria dos resultados são obtidos em testes *in vitro*, que retratam uma condição bem diferente daquela observada em campo e em aplicação direta nos órgãos das plantas, como frutos e folhas.

Na literatura científica, são escassos os trabalhos que relatam o efeito *in vivo* de extratos e óleos vegetais, principalmente sobre frutos cítricos, visando ao controle do bolor verde. É válido salientar ainda que, além da necessidade de estudos *in vivo*, outros fatores devem ser levados em consideração, como a composição química dos produtos. Como exemplo, o teor de safrol, princípio ativo do óleo essencial de pimenta longa, pode variar de acordo com o manejo das plantas, com a temperatura da região de cultivo, a disponibilidade hídrica, a radiação ultravioleta, a adubação etc. Nascimento *et al.* (2008) encontraram menor teor de safrol no óleo essencial de pimenta longa, obtido de plantas cultivadas em Lavras, MG, quando comparadas às plantas da região Amazônica. Portanto, a composição do óleo e a descrição precisa das condições em que ele foi obtido são necessárias para que se possa inferir sobre sua eficiência.

—●—	Água destilada	$\hat{Y} = 98,0969/1 + \exp(14,538 - 8,045^{**}D)$	$R^2 = 0,998$
.....○.....	Água destilada + tween	$\hat{Y} = 79,9098/1 + \exp(6,862 - 2,996^{**}D)$	$R^2 = 0,998$
---▼---	Imazalil	$\hat{Y} = 0$	
---△---	Thiabendazole	$\hat{Y} = 38,4498/1 + \exp(4,099 - 1,329^{**}D)$	$R^2 = 0,960$
—■—	Tiofanato Metílico	$\hat{Y} = 0$	
---□---	Óleo de Alho 1%	$\hat{Y} = 99,9425/1 + \exp(14,999 - 8,225^{**}D)$	$R^2 = 0,999$
—◆—	Cravo-da-Índia 0,5%	$\hat{Y} = 93,7011/1 + \exp(6,115 - 2,947^{**}D)$	$R^2 = 0,998$
—◇—	Óleo de nim 1%	$\hat{Y} = 97,1455/1 + \exp(14,243 - 7,767^{**}D)$	$R^2 = 0,998$
.....▲.....	Óleo de pimenta longa 0,5%	$\hat{Y} = 98,0969/1 + \exp(14,568 - 8,059^{**}D)$	$R^2 = 0,998$
---▽---	Biomassa cítrica 1%	$\hat{Y} = 65,9533/1 + \exp(3,991 - 1,038^{**}D)$	$R^2 = 0,967$
---●---	Quitosana 1%	$\hat{Y} = 72,2303/1 + \exp(6,829 - 1,988^{**}D)$	$R^2 = 0,996$



** Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste 't' de Student

Figura 1 – Estimativa da incidência do bolor verde em laranjas 'Valência' inoculadas com *Penicillium digitatum*, tratadas com diferentes fungicidas e produtos alternativos aos agroquímicos e incubadas a $21 \pm 1^\circ\text{C}$ e 85-90% de UR por sete dias (D).

Franco & Bettiol (2002) verificaram incidência do bolor verde em 80% de laranjas 'Pera' inoculadas e tratadas com extrato de *Azadiracta indica* (nim) a 10%, aos cinco dias após inoculação. No presente trabalho, logo no segundo dia, 76,2% das laranjas pulverizadas com o óleo de nim já apresentavam a doença (Tabela 1). Segundo Mossini & Kimmelmeier (2005), os efeitos precisos de vários tipos de extratos da árvore nim, quanto ao controle de pragas e doenças, são frequentemente difíceis de

serem apontados, uma vez que a complexidade dos compostos e seus diversos modos de ação dificultam a elucidação dos mecanismos envolvidos.

Tabela 1- Valores médios de incidência¹ (%) do bolor verde em laranjas ‘Valência’ inoculadas com *Penicillium digitatum*, tratadas com diferentes produtos alternativos aos agroquímicos e incubadas a 20 °C e 80% UR por sete dias

Tratamentos ³	Dias após a inoculação ²							
	0	1	2	3	4	5	6	7
Água	0 a	0 a	80,9 a	95,2 a	95,2 a	100 a	100 a	100 a
Água + t	0 a	0 a	23,8 c	71,4 b	76,2 a	80,9 b	80,9 b	80,9 b
Imazalil	0 a	0 a	0 d	0 d	0 d	0 d	0 d	0 d
Tiofanato	0 a	0 a	0 d	0 d	0 d	0 d	0 d	0 d
Thiabendaz.	0 a	0 a	4,8 d	23,8 c	23,8 c	38,1 c	38,1 c	38,1 c
Quitosana	0 a	0 a	0 d	23,8 c	52,4 b	71,4 b	71,4 b	71,4 b
Biomassa	0 a	0 a	4,8 d	28,6 c	28,6 c	52,4 c	61,9 b	61,9 b
Cr. Índia	0 a	0 a	42,9 b	85,7 a	90,5 a	95,2 a	95,2 a	95,2 a
Nim	0 a	0 a	76,2 a	95,2 a	95,2 a	95,2 a	100 a	100 a
Pim. Longa	0 a	0 a	80,9 a	95,2 a	95,2 a	100 a	100 a	100 a
Alho	0 a	0 a	80,9 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a

¹Incidência = (nº de frutos colonizados / nº total de frutos) x 100, sendo 21 frutos por tratamento.

²Grupos de médias seguidas de mesmas letras nas colunas não diferem entre si, ao nível de significância de 5%, pelo critério de Scott-Knott.

³Água – água destilada; Água + t – água destilada + 8 mL/L de tween 20; Tiofanato – tiofanato metílico; Thiabendaz. – thiabendazole; Quitosana – quitosana 10 mL/L + 8 mL/L de tween 20; Biomassa – biomassa cítrica 10 mL/L + 8 mL/L de tween 20; Cr. Índia – cravo-da-Índia 5 mL/L + 8 mL/L de tween 20; Nim – óleo de nim 10 mL/L + 8 mL/L de tween 20; Pim. Longa – óleo de Pimenta Longa 5 mL/L + 8 mL/L de tween 20; Alho – óleo de alho 10 mL/L + 8 mL/L de tween 20.

A Tabela 1 mostra o efeito dos tratamentos dentro de cada dia após a inoculação. A partir do segundo dia foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos. Apenas os fungicidas tiofanato metílico e imazalil foram capazes de manter os frutos sadios até o último dia de avaliação. Embora a biomassa cítrica e a quitosana tenham reduzido a incidência em 26,3% e 32,6%, respectivamente, em comparação à testemunha água no sétimo dia, esse nível de controle não é desejável para o consumo

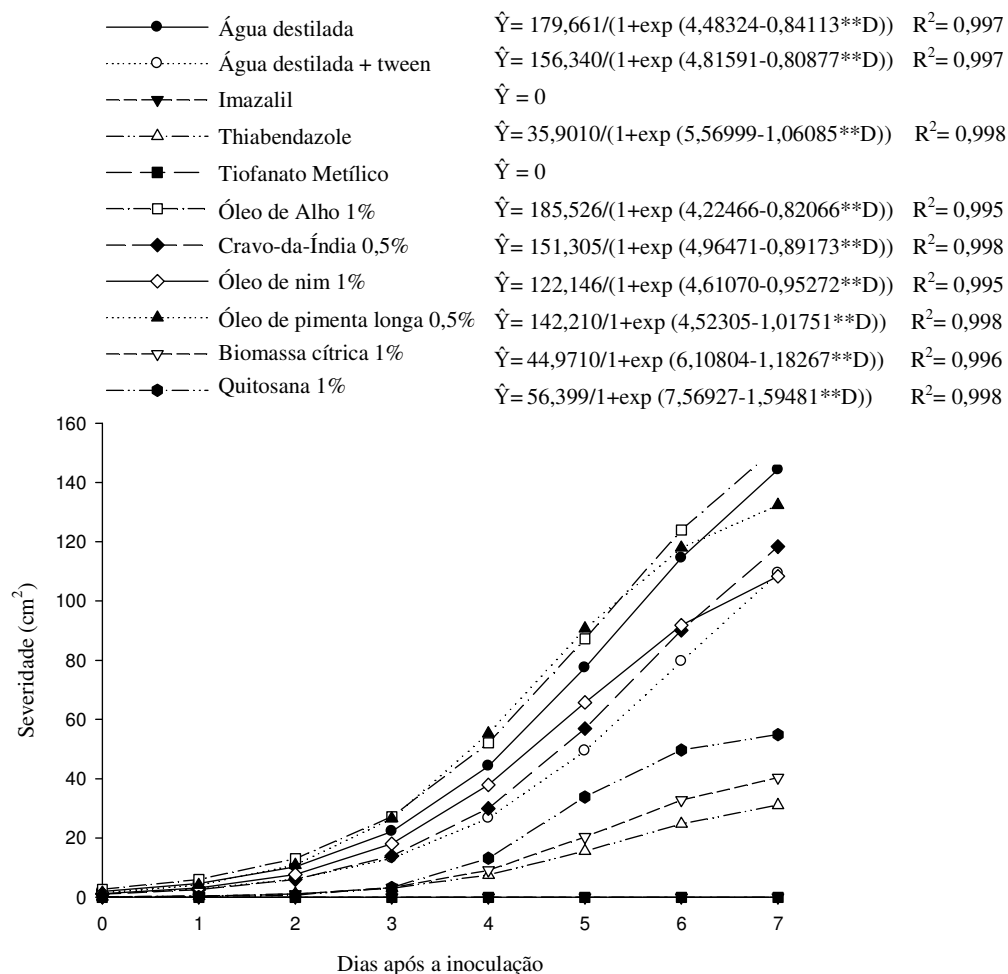
in natura, pois, mesmo em baixa ou média severidade, os frutos infectados se tornam impróprios comercialmente, além de serem fontes de inóculo. É possível que, em condições comerciais, o efeito desses produtos seja potencializado, uma vez que as condições do presente trabalho foram totalmente favoráveis ao desenvolvimento do patógeno.

Estes resultados demonstram a necessidade de estudos mais detalhados com tais produtos no que se refere ao modo de aplicação, tempo de imersão dos frutos, concentração, pH e temperatura da calda, possibilidade da utilização destes produtos como sanitizantes, reduzindo o inóculo superficial, e na desinfecção de ferimentos, dentre outros, devendo ser esses produtos testados em condições comerciais.

3.2. Severidade

A severidade ajustou-se ao modelo sigmoidal em função do tempo, tendo valores crescentes até o final do período avaliado (Figura 2).

A severidade da doença foi baixa até o segundo dia e, a partir de então, é possível verificar uma separação dos tratamentos. Os frutos tratados com biomassa cítrica e a quitosana acompanharam a tendência dos tratados com thiabendazole, evidenciando a capacidade desses produtos em reduzir o crescimento do patógeno em 59,6 e 62% no sétimo após inoculação, em relação à água. O imazalil e o tiofanato metílico controlaram totalmente a doença durante os sete dias de avaliação. Nos frutos tratados com óleo de alho, o desenvolvimento da doença foi semelhante ao relatado no Capítulo 1, confirmando seu baixo potencial de uso no controle de *P. digitatum* em frutos cítricos, uma vez que resultou em altos valores de severidade em laranja ‘Valência’ (Figuras 2 e 3).



** Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste 't' de Student

Figura 2 – Estimativa da severidade (cm^2) do bolor verde em laranjas 'Valência' inoculadas com *Penicillium digitatum*, tratadas com diferentes fungicidas e produtos alternativos aos agroquímicos e incubadas a $21 \pm 1^\circ\text{C}$ e 85-90% de UR por sete dias (D).



Figura 3 – Infestação de *P. digitatum* em laranjas ‘Valência’ aos 7 dias após a inoculação.

Araújo *et al.* (2009), avaliando o efeito de extrato aquoso de alho a 10%, extrato de bulbos frescos de alho obtidos pela infusão a 10% e extrato alcoólico de alho a 10 e 20%, verificaram redução no crescimento micelial de *P. roqueforti*, enquanto o extrato

alcoólico de alho a 25% não teve efeito sobre o crescimento micelial. Esses resultados demonstram que o aumento na concentração resulta em aumento da disponibilidade de componentes nutricionais para o desenvolvimento do patógeno (Araújo *et al.*, 2009) e que o modo de obtenção dos preparados, quer seja na forma de extrato ou de óleo essencial, afeta o rendimento dos princípios ativos (Sousa *et al.*, 1991). No presente trabalho, possivelmente, os princípios ativos responsáveis pela inibição do crescimento microbiano encontravam-se em baixa concentração no produto testado no presente trabalho ou em quantidade insuficiente para afetar o crescimento do patógeno.

Observa-se que a água+tween exerceu efeito de inibição no desenvolvimento do patógeno, uma vez que seus efeitos diferiram do da água (Tabela 2). O emulsificante Tween® (monoleato de sorbitano polioxiétileno), um surfactante não-iônico, tem sido muito empregado como agente dispersante na preparação das soluções. Entretanto, os surfactantes podem interagir com organismos, afetando sua atividade, e não existe quantidade padrão desse agente empregado na maioria das publicações (Nascimento *et al.*, 2008). Gomez-Lopez *et al.* (2005), empregando o emulsificante Tween® 80 como agente dispersante na preparação das soluções, observaram a interação deste emulsificante com *Aspergillus* spp.

O óleo de nim a 10 mL/L também mostrou baixa eficiência na redução do crescimento de *P. digitatum* em laranja 'Valência' (Figura 2). Arroteia *et al.* (2007), estudando o efeito de diversas concentrações do óleo de nim na produção de patulina por *P. expansum* em maçãs inoculadas, verificaram que, nas concentrações acima de 0,5%, não houve efetiva inibição na produção de micotoxina, provavelmente devido à diminuição da solubilidade do extrato oleoso em água. Segundo os autores, as concentrações menores foram mais efetivas na inibição, indicando que, provavelmente, tenha ocorrido um maior contato e absorção do extrato pelo fungo e pelo substrato (maçã).

O efeito dos tratamentos dentro dos dias pode ser observado pelo critério de Scott-Knott (Tabela 2). O thiabendazole mostrou-se menos efetivo que os outros fungicidas testados, contrariando os resultados obtidos por Franco & Bettiol (2000), que utilizaram o thiabendazole como fungicida-padrão no controle do bolor verde em laranjas 'Pera Rio', tendo obtido 100% de controle após 6 a 7 dias de incubação a 25 ± 5 °C. Benato *et al.* (2002) verificaram que o thiabendazole nas concentrações 500, 1000 e 2000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (i.a.) não foi eficiente no controle das podridões de maracujá-amarelo.

Tabela 2- Valores médios de severidade¹ (cm²) do bolor verde em laranjas ‘Valência’ inoculadas com *Penicillium digitatum*, tratadas com diferentes produtos alternativos aos agroquímicos e incubadas a 20 °C e 80% UR por sete dias

Tratamentos ³	Dias após a inoculação ²							
	0	1	2	3	4	5	6	7
Água	0 a	0 a	7,5 a	28,0 a	44,1 a	75,2 a	115,7 a	144,1 a
Água + t	0 a	0 a	2,3 a	16,0 b	27,0 b	50,7 b	77,6 b	110,1 b
Imazalil	0 a	0 a	0 a	0 c	0 c	0 d	0 e	0 e
Tiofanato	0 a	0, a	0 a	0 c	0 c	0 d	0 e	0 e
Thiabendaz.	0 a	0 a	0,4 a	3,9 c	7,5 c	15,1 c	25,1 d	30,9 d
Quitosana	0 a	0 a	0 a	3,2 c	14,1 c	32,5 c	51,4 c	53,9 c
Biomassa	0 a	0 a	12,2 a	4,3 c	18,2 c	32,8 c	63,2 c	74,3 c
Cr. Índia	0 a	0 a	2,2 a	16,8 b	30,7 b	56,7 b	89,3 b	118,7 b
Nim	0 a	0 a	5,5 a	23,0 b	37,3 b	62,4 b	95,4 b	106,9 b
Pim. Longa	0 a	0 a	0,2 a	25,7 b	37,3 b	71,9 a	104,2 a	139,8 a
Alho	0 a	0 a	11,8 a	33,8 a	52,1 a	82,6 a	127,3 a	151,3 a

¹Médias da área da lesão, descontando-se a área do diâmetro do ferimento.

²Grupos de médias seguidas de mesmas letras nas colunas não diferem entre si, ao nível de significância de 5%, pelo critério de Scott-Knott.

³Água – água destilada; Água + t – água destilada + 8 mL/L de tween 20; Tiofanato – tiofanato metílico; Thiabendaz. – thiabendazole; Quitosana – quitosana 10 mL/L + 8 mL/L de tween 20; Biomassa – biomassa cítrica 10 mL/L + 8 mL/L de tween 20; Cr. Índia – cravo-da-Índia 5 mL/L + 8 mL/L de tween 20; Nim – óleo de nim 10 mL/L + 8 mL/L de tween 20; Pim. Longa – óleo de Pimenta Longa 5 mL/L + 8 mL/L de tween 20; Alho – óleo de alho 10 mL/L + 8 mL/L de tween 20.

Dessa forma, produtos alternativos surgem como ferramenta de controle para o manejo integrado de doenças. A alternância de aplicação de agroquímicos com outros compostos alternativos combinados com medidas de controle cultural, a fim de se potencializarem os efeitos benéficos de cada prática, pode ser estratégia interessante no manejo de doenças nos campos de produção (Diniz *et al.*, 2006).

3.2. Período de incubação e período latente

A Tabela 3 mostra que, dentre os produtos alternativos testados no controle do bolor verde em laranja ‘Valência’, apenas a biomassa cítrica, quitosana e o cravo-da-índia formaram grupos de médias distintos da testemunha, indicando sua capacidade em atrasar o aparecimento dos primeiros sintomas e sinais do patógeno. Os efeitos da quitosana e da biomassa cítrica foram estatisticamente semelhantes aos do fungicida thiabendazole, causando atraso de aproximadamente três dias no aparecimento dos sintomas em relação à água. Como já descrito anteriormente, o imazalil e o tiofanato metílico foram eficientes em inibir o aparecimento do patógeno durante o período estudado. Esses resultados contrariam os verificados por Eckert *et al.* (1994), em trabalho com limão, em que o tratamento com imazalil não controlou a esporulação do fungo em alguns frutos, sugerindo o surgimento de isolados resistentes ao fungicida.

O tratamento água+tween formou um grupo de média diferente do da testemunha, com períodos de incubação e latente maiores, demonstrando a influência do emulsificante Tween 20 em aumentar esses períodos, como mencionado anteriormente em trabalhos de Nascimento *et al.* (2008) e Gomez-Lopez *et al.* (2005).

A extensão do período de incubação possibilita maior vida de prateleira dos frutos, e o atraso no aparecimento de estruturas do patógeno contribui para a redução da fonte de inóculo, visto que o grande número de esporos presentes na superfície dos frutos é facilmente disperso pelo ar, levando a uma alta incidência da doença. Os esporos são abundantes nos pomares e casas de embalagem, principalmente nos locais onde as caixas com os frutos vindos do pomar são recebidas e selecionadas (Fischer *et al.*, 2008).

Tabela 3- Período de incubação e período latente médio de *Penicillium digitatum* em laranjas ‘Valência’ tratadas com diferentes produtos alternativos aos agroquímicos e incubadas a 20 °C e 80% UR por sete dias

Tratamentos ¹	Período de incubação ² (dias)	Período latente ² (dias)
Água	2,28 d	2,52 d
Água + t	3,67 c	4,09 c
Imazalil	7,00 a	7,00 a
Tiofanato	7,00 a	7,00 a
Thiabendaz.	5,71 b	6,28 b
Quitosana	4,90 b	5,76 b
Biomassa	5,24 b	5,95 b
Cr. Índia	2,90 c	3,34 c
Nim	2,38 d	2,67 d
Pim. Longa	2,28 d	2,43 d
Alho	2,19 d	2,57 d

¹Água – água destilada; Água + t – água destilada + 8 mL/L de tween 20; Tiofanato – tiofanato metílico; Thiabendaz. – thiabendazole; Quitosana – quitosana 10 mL/L + 8 mL/L de tween 20; Biomassa – biomassa cítrica 10 mL/L + 8 mL/L de tween 20; Cr. Índia – cravo-da-Índia 5 mL/L + 8 mL/L de tween 20; Nim – óleo de nim 10 mL/L + 8 mL/L de tween 20; Pim. Longa – óleo de Pimenta Longa 5 mL/L + 8 mL/L de tween 20; Alho – óleo de alho 10 mL/L + 8 mL/L de tween 20.

²Médias seguidas de mesmas letras nas colunas não diferem entre si, ao nível de significância de 5%, pelo critério de Scott-Knott.

O insucesso dos óleos de nim, pimenta longa e alho em retardar o aparecimento dos sintomas e dos sinais do patógeno pode estar relacionado às características do patossistema *P. digitatum* – *Citrus reticulata*: alta agressividade do patógeno, alta suscetibilidade do hospedeiro e condições favoráveis do ambiente.

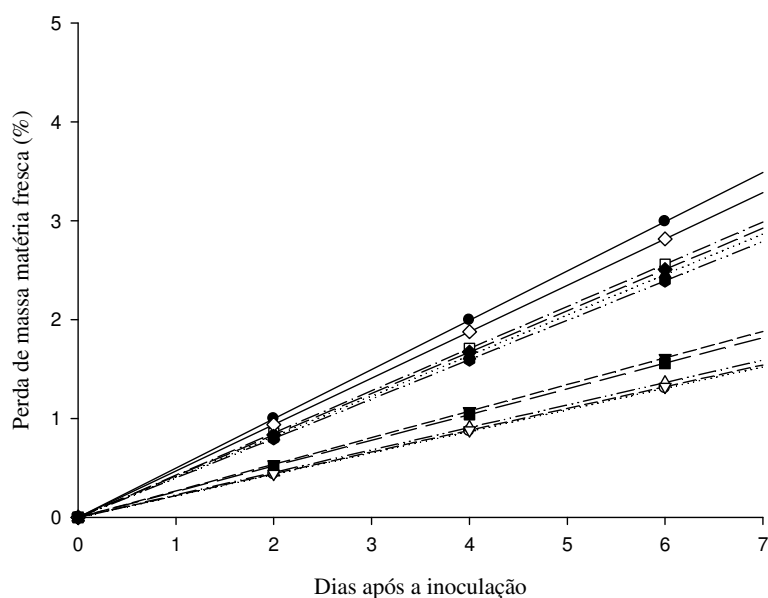
3.3. Perda de massa da matéria fresca

A perda de massa da matéria fresca aumentou linearmente em função dos dias após inoculação (D) dos fungicidas e produtos alternativos (Figura 4). Os frutos tratados com óleo de nim e os da testemunha água tiveram os maiores valores de perda de

massa, enquanto menor perda foi verificada nos frutos tratados com thiabendazole e água+tween. Os demais tratamentos apresentam valores intermediários.

A perda de massa da matéria fresca se correlacionou positivamente com a severidade e a incidência da doença e com a produção de CO₂, cujos coeficientes foram 0,78**; 0,56** e 0,82**, respectivamente. Com o ataque do patógeno e o consequente aumento da severidade, as membranas celulares vão perdendo a permeabilidade e ocorre desestruturação de cutículas e paredes celulares, resultando em extravasamento de solutos que contribui para maior disponibilidade de nutrientes para o crescimento do fungo e aumento da perda de massa. A Tabela 4 mostra que somente no último dia de avaliação houve diferenças significativas entre os efeitos dos tratamentos. Os maiores valores foram observados nos frutos tratados com água e óleo de nim, nos quais também foram verificados altos valores para severidade e incidência da doença, enquanto as menores perdas foram verificadas quando foram utilizados os fungicidas, a biomassa cítrica e a água+tween. É possível que estes produtos tenham propiciado a formação de uma barreira diminuindo o déficit de pressão entre o fruto e a atmosfera circundante e, principalmente, mantiveram a integridade celular, contribuindo para uma baixa perda de massa.

—●—	Água destilada	$\hat{Y} = 0,4984^{**}D$ $r^2 = 0,939$
⋯○⋯	Água destilada + tween	$\hat{Y} = 0,2176^{**}D$ $r^2 = 0,998$
- - ▾ - -	Imazalil	$\hat{Y} = 0,2688^{**}D$ $r^2 = 0,996$
- - △ - -	Thiabendazole	$\hat{Y} = 0,2274^{**}D$ $r^2 = 0,997$
- - ■ - -	Tiofanato Metílico	$\hat{Y} = 0,2598^{**}D$ $r^2 = 0,998$
- - □ - -	Óleo de Alho 1%	$\hat{Y} = 0,4267^{**}D$ $r^2 = 0,919$
- - ◆ - -	Cravo-da-Índia 0,5%	$\hat{Y} = 0,4178^{**}D$ $r^2 = 0,918$
- - ◇ - -	Óleo de nim 1%	$\hat{Y} = 0,4694^{**}D$ $r^2 = 0,868$
⋯▲⋯	Óleo de pimenta longa 0,5%	$\hat{Y} = 0,4095^{**}D$ $r^2 = 0,921$
- - ▽ - -	Biomassa cítrica 1%	$\hat{Y} = 0,3319^{**}D$ $r^2 = 0,982$
- - ● - -	Quitossana 1%	$\hat{Y} = 0,3987^{**}D$ $r^2 = 0,950$



** Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste 't' de Student

Figura 4 – Estimativa da perda de massa da matéria fresca em laranjas 'Valência' inoculadas com *Penicillium digitatum*, tratadas com diferentes fungicidas e produtos alternativos aos agroquímicos e incubadas a $21 \pm 1^\circ\text{C}$ e 85-90% de UR por sete dias (D).

Embora se observe a formação de grupos distintos quanto à perda de massa da matéria fresca, todos os produtos possibilitaram valores inferiores a 5%, limite máximo aceitável para a comercialização de produtos hortícolas.

Tabela 4- Valores médios de perda de massa da matéria fresca¹ de laranjas ‘Valência’ inoculadas com *Penicillium digitatum*, tratadas com diferentes produtos alternativos aos agroquímicos e incubadas a 20 °C e 80% UR

Tratamentos ³	Dias após a inoculação ²			
	0	3	5	7
Água	0 a	0,54 a	1,38 a	3,55 a
Água + t	0 a	0,37 a	0,88 a	1,32 c
Imazalil	0 a	0,44 a	1,02 a	1,68 c
Tiofanato	0 a	0,44 a	0,96 a	1,57 c
Thiabendaz.	0 a	0,37 a	0,88 a	1,36 c
Quitosana	0 a	0,60 a	1,33 a	2,63 b
Biomassa	0 a	0,38 a	0,94 a	1,80 c
Cr. Índia	0 a	0,33 a	1,05 a	3,05 b
Nim	0 a	0,13 a	1,10 a	3,60 a
Pim. Longa	0 a	0,36 a	1,07 a	2,98 b
Alho	0 a	0,37 a	1,11 a	3,12 b

¹ % PMMF = (peso inicial – peso final) * 100 / peso inicial

² Grupos de médias seguidas de mesmas letras nas colunas não diferem entre si, ao nível de significância de 5%, pelo critério de Scott-Knott.

³ Água – água destilada; Água + t – água destilada + 8 mL/L de tween 20; Tiofanato – tiofanato metílico; Thiabendaz. – thiabendazole; Quitosana – quitosana 10 mL/L + 8 mL/L de tween 20; Biomassa – biomassa cítrica 10 mL/L + 8 mL/L de tween 20; Cr. Índia – cravo-da-Índia 5 mL/L + 8 mL/L de tween 20; Nim – óleo de nim 10 mL/L + 8 mL/L de tween 20; Pim. Longa – óleo de Pimenta Longa 5 mL/L + 8 mL/L de tween 20; Alho – óleo de alho 10 mL/L + 8 mL/L de tween 20.

3.4. Produção de CO₂

Os frutos de todos os tratamentos apresentaram taxa respiratória baixa, entre 17,7 e 32,5 mg CO₂.kg⁻¹.h⁻¹ nos dois primeiros dias que se seguiram à inoculação de *P. digitatum* (Figura 5). A partir daí, a taxa respiratória aumentou nos frutos tratados com água destilada, óleo de alho, cravo-da-índia, óleo de nim, óleo de pimenta longa, biomassa cítrica e quitosana, coincidindo com o início do aparecimento e com o aumento da área afetada pela doença, como pode ser observado pelos dados de incidência e severidade (Figuras 1 e 2). Dentre esses frutos, aqueles tratados com biomassa cítrica tiveram o menor aumento da taxa respiratória, devido à menor área colonizada pelo fungo. Além dos danos aos tecidos celulares decorrentes do ataque do

patógeno como também da injúria causada no fruto pelo tubo preenchido por agulhas, atribui-se a alta produção de CO₂ ao fato de o *P. digitatum* ser reconhecidamente um fungo que produz grande quantidade de etileno (Fukuda & Ogawa, 1991), que estimula a respiração.

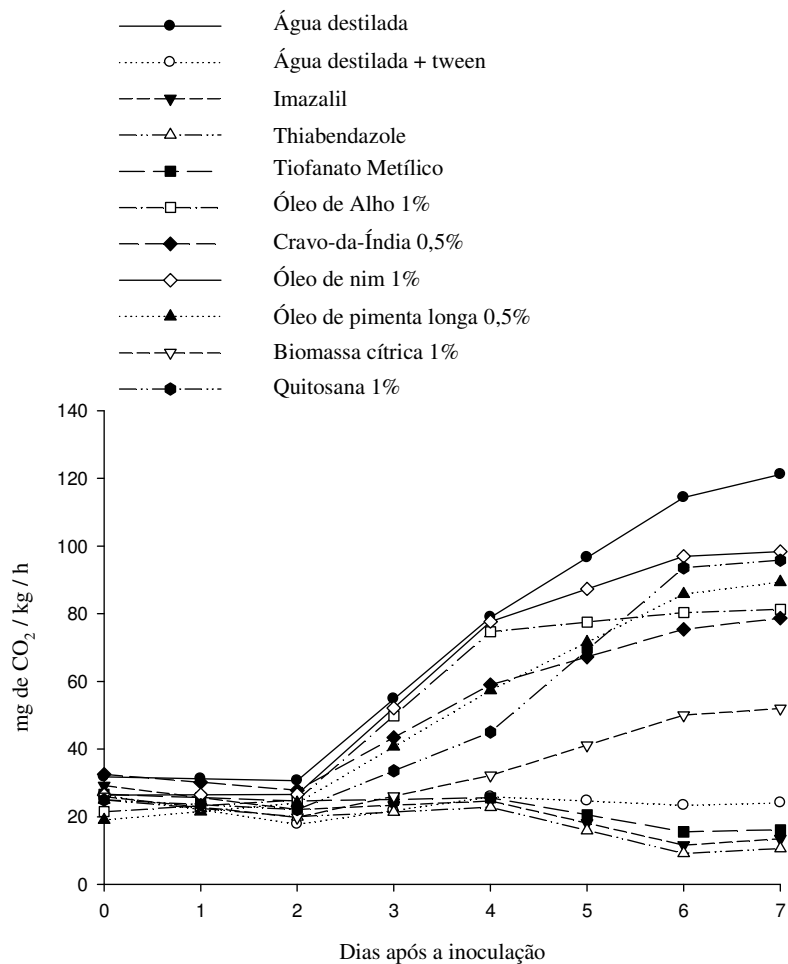


Figura 5 – Taxa respiratória (mg de CO₂/kg/h) de laranjas ‘Valência’ tratadas com fungicidas e produtos alternativos.

Ao contrário dos demais, nos frutos tratados com imazalil, thiabendazole, tiofanato metílico e água + tween a taxa respiratória praticamente não se alterou ao longo do período de avaliação, apresentando padrão respiratório típico dos frutos não-climatéricos. Observa-se, nos tratamentos efetivos no controle da doença, que a produção de CO₂ se manteve baixa, assim como a severidade e incidência, como pode ser comprovado pelos valores dos coeficientes de correlação 0,69** e 0,71**, respectivamente.

4. CONCLUSÕES

- Dentre os produtos alternativos testados, biomassa cítrica e quitosana apresentam potencial para controle do bolor verde em laranja 'Valência';
- Óleos de alho, pimenta longa e nim não foram efetivos no controle do bolor verde em laranja 'Valência';
- Imazalil e tiofanato metílico controlam totalmente o bolor verde em laranja 'Valência' no período de sete dias.

CONCLUSÕES GERAIS

Com exceção do óleo de alho, todos os produtos alternativos, com destaque para a biomassa cítrica, tiveram efeito sobre *P. digitatum* em tangerinas ‘Poncã’. Em laranja ‘Valência’, tanto a biomassa cítrica quanto a quitosana mostraram potencial para serem utilizadas no controle do bolor verde. Assim como em tangerinas, o óleo de alho não controlou a doença e, ainda, os óleos essenciais de pimenta longa e nim também não se mostraram efetivos no controle do bolor verde em laranja ‘Valência’.

Embora os efeitos dos produtos alternativos e dos fungicidas sejam semelhantes tanto em tangerinas como em laranjas, é possível observar que estas últimas apresentaram menor área colonizada por *P. digitatum*, considerando-se o mesmo período de tempo. Tal fato pode estar relacionado a características intrínsecas à espécie como, por exemplo, maior resistência da parede celular. A rigidez da parede celular confere ao fruto melhor capacidade de defesa contra toxinas e enzimas hidrolíticas produzidas pelo patógeno. Além disso, frutos que apresentam maiores espaços intercelulares, como a tangerina ‘Poncã’, podem facilitar a penetração do patógeno. Os produtos utilizados que foram capazes de reduzir a doença talvez possam ter sua efetividade aumentada com a utilização de doses um pouco maiores, desde que não causem fitotoxidez.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abreu, F. M.; Lourenço, S. A.; Bassetto, E.; Gonçalves, F. P.; Martins, M. C.; Amorim, L. Efeito de sanificantes no controle pós-colheita da podridão parda (*Monilinia fructicola*) e da podridão mole (*Rhizopus stolonifer*) em pêssegos. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 34, n. 1, p. 83-85, 2008.

AGRIANUAL. **Anuário da Agricultura Brasileira**. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio, p. 271-300, 2009.

AGROFIT. **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários**. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons> Acesso em: 06 de dezembro de 2009.

Araújo, R. C. Z.; Chalfoun, S. M.; Angélico, C. L.; Araújo, J. B. S.; Pereira, M. C. Avaliação *in vitro* da atividade fungitóxica de extratos de condimentos na inibição de fungos isolados de pães artesanais. **Ciência & Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 2, p. 545-551, 2009.

Arroteia, C. C.; Kimmelmeier, C. e Machinski Juúnior, M. Efeito dos extratos aquoso e oleoso de nim [*Azadirachta indica* A. Juss (Meliaceae)] na produção de patulina em maçãs contaminadas por *Penicillium expansum*. **Ciência Rural**, v.37, n.6, p.1518-1523, 2007.

Bastos, C.N. Efeito do óleo de *Piper aduncum* sobre *Crinipellis pernicioso* e outros fungos fitopatogênicos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 22, n. 3, p. 441-443, 1997.

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

Benato, E. A.; Sigrist, J. M. M.; Hanashiro, M. M.; Magalhães, M. J. M. e Binotti, C. S. Avaliação de fungicidas e produtos alternativos no controle de podridões pós-colheita em maracujá-amarelo. **Summa Phytopathologica**, v. 28, n. 4, p. 299-304, 2002.

Biale, J. B. The postharvest biochemistry of tropical and subtropical fruits. **Advances in Food Research**, New York, v. 10, p. 293-354, 1960.

Boteon, M.; Neves, E. M. Citricultura brasileira: aspectos econômicos. In: Mattos Junior, D.; De Negri, J. D.; Pio, R. M. (Eds.) **Citros**. Campinas: Instituto Agrônomo de Campinas e Fundag, 2005. p. 19-36.

Bus, V. G.; Bongers, A. J.; Risse, L. A. Occurrence of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* resistant to benomyl, thiabendazole, and imazalil on citrus fruit from different geographic origins. **Plant Disease**, v. 75, n. 11, p. 1098-1100, 1991.

Camili, E. C.; Benato, E. A.; Pascholati, S. F. e Cia, P. Avaliação da quitosana, aplicada em pós-colheita, na proteção de uva 'Itália' contra *Botrytis cinerea*. **Summa Phytopathologica**, v. 33, n. 3, p 215-221, 2007.

Chitarra, M. I. F. & Chitarra, A. B. **Pós-colheita de Frutas e Hortaliças: fisiologia e manuseio**. 2 ed. Lavras: UFLA, 2005. 785 p.

Cia, P.; Pascholati, S. F. e Benato, E. A. Indução de resistência no manejo de doenças pós-colheita. In: Rodrigues, F. Á.; Romeiro, R. D. S. (Ed.). **Indução de resistência em plantas a patógenos**. Viçosa: UFV, Imprensa Universitária, p. 245-280, 2007.

Coelho, Y. S. **Tangerinas para exportação: aspectos técnicos de produção**. Brasília: Embrapa, SPI, 1996. 42p. (Série Publicações Técnicas FRUPEX; 24).

Costa, L.C.B.; Corrêa, R.M.; Cardoso, J.C.W.; Pinto, J.E.B.P.; Bertolucci, S.K.V.; Ferri, P.H. Secagem e fragmentação da matéria seca no rendimento e composição do óleo essencial de capim-limão. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.23, n.4, p.956-959, out-dez 2005.

Cunico, M. M.; Miguel, O. G.; Miguel, M. D.; Carvalho, J. L. S.; Peitz, C.; Stangarlin, J. R.; Schwan-Estrada, K. R. F.; Cruz, M. E. S.; Nozaki, M. H. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 11, p. 16 -21. 1999.

Diniz, L. P.; Maffia, L. A.; Dhingra, O. D.; Casali, V. W. D.; Santos, R. H. S.; Mizubuti, E. S. G. Avaliação de produtos alternativos para controle da requeima do tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.31, n. 2, p. 171-179, 2006.

Eckert, J. W.; Sievert, J. R.; Ratnayake, M. Reduction of imazalil effectiveness against citrus green mold in California packinghouses by resistant biotypes of *Penicillium digitatum*. **Plant Disease**, v.78, p.971-974, 1994.

FAO. **Food and Agriculture Organization**. Disponível em: <http://faostat.fao.org>. Acesso em 29 de novembro de 2009.

Fischer, I. H. Lourenço, S. A.; Amorim, L. Doenças pós-colheita em citros e caracterização da população fúngica ambiental no mercado atacadista de São Paulo. **Tropical Plant Pathology**, v.33, n.3, p.219-226, 2008.

Franco, D. A. S.; Bettiol, W. Controle de *Penicillium digitatum* em pós-colheita de citros com produtos alternativos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 25, n. 4, p. 602-606, 2000.

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**, v. 24, n. 2, p. 569-572, 2002.

Fukuda, H.; Ogawa, T. Microbial ethylene production. In: Mattoo, A. K.; Suttle, J. C. (Ed.). **The plant hormone ethylene**. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, p. 279-292, 1991.

Gomez-Lopez, A.; Aberkane, A.; Petrikkou, E.; Mellado, E.; Rodriguez-Tudela, J.L.; Cuenca-Estrella, M. Analysis of the influence of tween concentration, inoculum size, assay medium, and reading time on susceptibility testing of *Aspergillus* spp. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 1251-1255, 2005.

Hanada, R. E.; Gasparotto, L. & Pereira, J. C. R. Eficiência de desinfestantes na erradicação de conídios de *Mycosphaerella fijiensis* aderidos à superfície de bananas. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p. 94-96, 2004.

Holmes, G. J.; Eckert, J. W. Sensitivity of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* to postharvest citrus fungicides in California. **Phytopathology**, v. 89, p. 716-721, 1999.

Laranjeira, F. F.; Amorim, L.; Bergamim, A. F.; Vildoso, C. I. A. Controle das doenças causadas por fungos e bactérias em citros. In: Zambolim, L.; Vale, F. X. R.; Monteiro, A. J. A.; Costa, H. (Eds.) **Controle de doenças de plantas Fruteiras**. Viçosa: UFV, Imprensa Universitária, 2002. p. 141-246.

Laranjeira, F. F.; Amorim, L.; Bergamin, A. F.; Vildoso, C. I. A.; Colleta Filho, H. D. Fungos, procaríotos e doenças abióticas. In: Mattos Junior, D.; De Negri, J. D.; Pio, R. M. (Eds.) **Citros**. Campinas: Instituto Agronômico de Campinas e Fundag, 2005. p. 509-566.

Margarim, M. B.; Cantillano, R. F. F.; Treptow, R. O. Conservação de tangerinas cv. Clemenules utilizando diferentes recobrimentos. **Acta Scientia Agronomica**, v. 29, n. 1, p. 75-82, 2007.

Martins, L. F. **Caracterização do complexo celulásico de *P. echinulatum***. 2005. 121 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

Martins, D. N. **Desverdescimento da tangerina ‘Poncã’ (*Citrus reticulata*, Blanco) sob diferentes concentrações de etileno e temperaturas**. 2003. 57 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

Mazaro, S. M.; Deschamps, C.; Mio, L. L. M.; Biasi, L. A.; Gouvea, A.; Sautter, C. K. Comportamento pós-colheita de frutos de morangueiro após a aplicação pré-colheita de quitosana e acibenzolar-s-metil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 1, p. 185-190, 2008.

Moraes, I.V.M. **Morango processado minimamente e conservado sob refrigeração e atmosfera controlada**. 2005. 98p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) - Faculdade de Engenharia Agrícola, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

Mossini, S. A. G. & Kimmelmeier, C. A árvore Nim (*Azadirachta indica* A. Juss): Múltiplos Usos. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 24, n. 1, p. 139-48, 2005.

Mytle, N.; Anderson G. L.; Doyle M. P.; Smith, M. A. Antimicrobial activity of clove (*Syzygium aromaticum*) oil in inhibiting *Listeria monocytogenes* on chicken frankfurters. **Food Control**, v. 17, p. 102-107, 2004.

Nascimento, F. R.; Cardoso, M. G.; Souza, P. E.; Lima, R. K.; Salgado, A. P. S. P.; Guimarães, L. G. L. Efeito do óleo essencial de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC) e do emulsificante Tween® 80 sobre o crescimento micelial de *Alternaria alternata* (Fungi: Hyphomycetes). **Acta Amazonica**, v. 38, n. 3, p. 503 - 508, 2008.

Oliveira, J. J. do V.; Toledo, M. C. de F. Níveis residuais de thiabendazol e imazalil em frutos laranja – pera tratadas por imersão em pós-colheita. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 22, n. 3, p. 339-344, 2000.

Pereira, M. C.; Vilela, G. R.; Costa, L. M. A. S.; Silva, R. F.; Fernandes, A. F.; Fonseca, E. W. N.; Piccoli, R. H. Inibição do desenvolvimento fúngico através da utilização de óleos essenciais de condimentos. **Ciência & Agrotecnologia**, v. 30, n. 4, p. 731-738, 2006.

Petracek, P. D.; Montalvo, L. The degreening of ‘Fallgro’ tangerine. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 122, n. 4, p. 547-552, 1997.

Pio, R.M. Tangerinas para o verão. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 14, n. 2, p. 539-9, 1993.

Programa Brasileiro para a Melhoria dos Padrões Comerciais e Embalagens de Hortigranjeiros. **Classificação da Laranja (*Citrus sinensis*, Osbeck)**. Centro de Qualidade em Horticultura – CEAGESP. Junho de 2000.

Programa Brasileiro para a Melhoria dos Padrões Comerciais e Embalagens de Hortigranjeiros. **Classificação das Tangerinas**. Centro de Qualidade em Horticultura – CEAGESP. Agosto de 2000.

SAEG – **Sistema para análises estatísticas**, versão 9.1. Viçosa: Fundação Arthur Bernardes, UFV. 2007. CD ROM.

Santos, L. C.; Montero, C. R. S.; Schwarz, L. L.; Andrezza, C. S.; Camillo, M. F.; Silva, S. J. N.; Bender, R. J. Danos mecânicos por compressão alteram as características qualitativas em tangerinas ‘Ponkan’. In: Congresso Brasileiro de Fruticultura, 20, 2008, Vitória. **Anais...** Vitória: SBF, 2008. CD-ROM.

Sousa, M. M. M.; Lédo, F. J. S. & Pimentel, F. A. Efeito da adubação e do calcário na produção de matéria seca e de óleo essencial de pimenta-longa. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n. 3, p. 405-409, 2001.

Souza, S. M. C.; Pereira, M. C.; Angélico, C. L.; Pimenta, C. J. Avaliação de óleos essenciais de condimentos sobre o desenvolvimento micelial de fungos associados a produtos de panificação. **Ciência & Agrotecnologia**, v. 28, n. 3, p. 685-690, 2004.

Souza, B. A. M.; Barbosa, A. P.; Dias, M. S. C.; Souza, D. A.; Mota, L. H. C.; Barbosa, J.G. Controle de bolor verde causado pelo fungo *Penicillium digitatum* em lima ácida Tahiti produzida no Projeto Jaíba, Norte de Minas Gerais. In: Congresso Brasileiro de Fruticultura, 20, 2008, Vitória. **Anais...** Vitória: SBF, 2008. CD-ROM.

Souza, A. E. F.; Araújo, E.; Nascimento, L. C. Atividade antifúngica de extratos de alho e capim-santo sobre o desenvolvimento de *Fusarium proliferatum* isolado de grãos de milho. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, n. 6, p. 465-471, 2007.

Sticher, L.; Mauch Mani, B.; Mettraux, J. P. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 35, p. 235-270, 1997.

Toffano, L. **Doenças pós-colheita de citros: potencial do *Lentinula edodes*, *Agaricus blazei*, ácido jasmônico, albedo (*Citrus sinensis* var. Valência) e flavedo (*Citrus aurantifolia* var. Tahiti) no controle e na indução de resistência.** 2005. 86 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

Whiteside, J. O.; Garnsey, S. M.; Timmer, L. W. **Compendium of citrus disease.** 2 ed. St Paul: APS Press, 1993. 87 p.

Wild, B. L.; ECKERT, J. W. Synergy between a benzimidazole-sensitive isolate and benzimidazole-resistant isolates of *Penicillium digitatum*. **Phytopathology**, v. 72, p. 1329-1332, 1982.

Zambolim, L. Tipos de fungicidas empregados no controle de plantas. In: Zambolim, L.; Picanço, M. C.; Silva, A. A.; Ferreira, L. R.; Ferreira, F. A. e Jesus, W. C. J. (Ed.). **Produtos Fitossanitários (fungicidas, inseticidas, acaricidas e herbicidas).** Viçosa: UFV, Imprensa Universitária, 2008. p. 263-347.

Zhang, D.; Quantick, P. C. Effects of chitosan coating on enzymatic browning and decay during postharvest storage of litchi (*Litchi sinensis* Sonn.) fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.12, p.195-202, 1997.

APÊNDICE

Quadro 1A - Resumo da análise de variância da incidência e severidade do bolor verde e perda de matéria fresca (PMF) em tangerinas 'Poncã' inoculadas com *Penicillium digitatum*, tratadas com diferentes produtos alternativos aos agroquímicos e incubadas a 21±1 °C e 85-90% UR por oito dias

Fontes de variação	Graus de liberdade	Quadrado Médio		
		Incidência	Severidade	PMF
Tratamento	10	16910,05**	13439,07**	3,38**
Resíduo	77	216,98	167,82	0,65
Dias	8	131590,90**	169381,20**	231,85**
Dias x Tratamento	80	1568,42**	1536,74**	1,69**
Resíduo (b)	540	199,34	177,80	0,16
CV ¹ (%)		26,51	30,14	25,87
CV ² (%)		31,03	25,41	13,47

** Efeito significativo ao nível de 1% de significância, pelo teste F.

CV¹ – coeficiente de variação da parcela; CV² – coeficiente de variação da subparcela.

Quadro 1B - Resumo da análise de variância do período de incubação e período latente do bolor verde em tangerinas 'Poncã' inoculadas com *Penicillium digitatum*, tratadas com diferentes produtos alternativos aos agroquímicos e incubadas a 21±1 °C e 85-90% UR por oito dias

Fontes de variação	Graus de liberdade	Quadrado Médio	
		Período de incubação	Período latente
Tratamento	10	11,42**	14,08**
Resíduo	66	0,45	0,41
CV(%)		17,29	14,88

** Efeito significativo ao nível de 1% de significância, pelo teste F.

CV – coeficiente de variação.

Quadro 1C - Estimativa dos coeficientes de correlação entre as variáveis severidade, incidência, perda de massa da matéria fresca (PMMF) e produção de CO₂ em tangerinas 'Poncã' inoculadas com *Penicillium digitatum*, tratadas com diferentes produtos alternativos aos agroquímicos e incubadas a 21±1 °C e 85-90% UR por oito dias

	severidade	incidência	PMMF	CO ₂
severidade	1,00			
incidência	0,62**	1,00		
PMMF	0,66**	0,59**	1,00	
CO ₂	0,55**	0,66**	0,40**	1,00

** significativo a 1% de significância, pelo teste 't'.

Quadro 2A - Resumo da análise de variância da incidência e severidade do bolor verde e perda de matéria fresca (PMMF) em laranjas ‘Valência’ inoculadas com *Penicillium digitatum*, tratadas com diferentes produtos alternativos aos agroquímicos e incubadas a 21±1 °C e 85-90% UR por sete dias

Fontes de variação	Graus de liberdade	Quadrado Médio		
		Incidência	Severidade	PMF
Tratamento	10	45398,27**	26044,30**	0,51**
Resíduo	66	1231,36	826,29	0,08
Dias	7	65969,65**	75545,65**	24,92**
Dias x Tratamento	70	2719,64**	3430,44**	0,38**
Resíduo (b)	462	181,40	130,43	0,04
CV ¹ (%)		79,18	97,84	30,78
CV ² (%)		30,39	38,87	22,50

** Efeito significativo ao nível de 1% de significância, pelo teste F.

CV¹ – coeficiente de variação da parcela; CV² – coeficiente de variação da subparcela.

Quadro 2B - Resumo da análise de variância do período de incubação e período latente do bolor verde em laranjas ‘Valência’ inoculadas com *Penicillium digitatum*, tratadas com diferentes produtos alternativos aos agroquímicos e incubadas a 21±1 °C e 85-90% UR por sete dias

Fontes de variação	Graus de liberdade	Quadrado Médio	
		Período de incubação	Período latente
Tratamento	10	25,30**	25,33**
Resíduo	66	0,69	0,92
CV(%)		20,19	21,31

** Efeito significativo ao nível de 1% de significância, pelo teste F.

CV – coeficiente de variação.

Quadro 2C - Estimativa dos coeficientes de correlação entre as variáveis severidade, incidência, perda de massa da matéria fresca (PMMF) e produção de CO₂ em laranjas ‘Valência’ inoculadas com *Penicillium digitatum*, tratadas com diferentes produtos alternativos aos agroquímicos e incubadas a 21±1 °C e 85-90% UR por sete dias

	severidade	incidência	PMMF	CO ₂
severidade	1,00			
incidência	0,56**	1,00		
PMMF	0,78**	0,56**	1,00	
CO ₂	0,69**	0,71**	0,81**	1,00

** significativo a 1% de significância, pelo teste ‘t’.