

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CAMPUS DE FREDERICO WESTPHALEN
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA:
AGRICULTURA E AMBIENTE

Ricardo Bauer Pilla

**MÉTODOS ALTERNATIVOS NO CONTROLE DE PODRIDÕES DE
MORANGO E MAÇÃ**

Frederico Westphalen, RS
2021

Ricardo Bauer Pilla

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Agronomia, Agricultura e Ambiente, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Agronomia**.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a. Denise Schmidt

Frederico Westphalen, RS
2021

Bauer Pilla, Ricardo

MÉTODOS ALTERNATIVOS NO CONTROLE DE PODRIDÕES
DE MORANGO E MAÇÃ / Ricardo Bauer Pilla.- 2021.
110 p.; 30 cm

Orientadora: Denise Schmidt

Coorientador: Daniel Alexandre Neuwald

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Campus de Frederico Westphalen, Programa de Pós
Graduação em Agronomia - Agricultura e Ambiente, RS, 2021

1. Óleos essenciais 2. Tratamento térmico 3. Pós
colheita 4. Atmosfera controlada 5. Cloreto de cálcio
I. Schmidt, Denise II. Neuwald, Daniel Alexandre III.
Título.

Ricardo Bauer Pilla

**MÉTODOS ALTERNATIVOS NO CONTROLE DE PODRIDÕES DE
MORANGO E MAÇÃ**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Agronomia, Agricultura e Ambiente, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Agronomia**.

Aprovado em 10 de junho de 2021:

Denise Schmidt, Dr^a. (UFSM)
(Orientadora)

Daniel Alexandre Neuwald, Dr. (KOB)
(Coorientador)

Stela Maris Kulczynski, Dr^a. (UFSM)

Frederico Westphalen, RS
2021

À minha família pelo incentivo,
À minha mãe pela batalha vencida,
À minha namorada pelo apoio,
Às minhas avós,
Nadir (*in memoriam*) e Jurema,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao Grande Arquiteto do Universo e Ser Superior que sempre me acompanha e guia.

À minha família pelo incentivo ao estudo e apoio sempre prestado, em todas as horas e decisões, seja na proximidade ou na distância, fossem elas decisões fáceis ou difíceis. Sempre estiveram presentes, não teve um dia que deixei de pensar e honrar vocês todos, pelos princípios e valores que me foram ensinados. Meu muito obrigado, pai Elcio, Mãe Márcia, Vó Jurema, Vô Elio e meu irmão Eduardo.

À minha namorada Jackeline, pelo amor, confiança, compreensão, companheirismo e apoio em todos os momentos... Obrigado por me compreender sempre que precisei ficar mais tempo trabalhando ou estudando, sempre foi e é em prol de nossos objetivos...

À minha orientadora e professora Dr^a. Denise Schmidt, orientadora e amiga, pelo auxílio e confiança depositada em mim e pelos ensinamentos transmitidos. Obrigado por me acolher e consentir nas decisões tomadas ao longo deste período.

Ao meu coorientador e “Professor Pardal” (se assim, com todo respeito me permite chamar), Dr. Daniel Neuwald, por todo o apoio prestado que começou muito antes do início do intercâmbio para que este em tempos de pandemia se tornasse realidade. Obrigado pelas orientações, ajudas e auxílios que nunca me negastes, pela amizade e confiança.

À professora Dr^a. Stela Maris Kulczynski pela cedência do laboratório e materiais disponibilizados, assim como orientações e dicas prestadas para realização dos trabalhos ainda no Brasil.

À minha amiga e “irmã” Fernanda Marcolan de Souza pela grande amizade e companheirismo de sempre.

Aos colegas do Grupo de Pesquisa do Laboratório de Extrativos Aromáticos: Axel Mariotto, Gabrieli Azevedo, Jordana da Rosa, Joao de Cristo e Matheus Milani e ao laboratorista Davi de Oliveira, pela ajuda prestada sempre quando necessitado, meu muito obrigado.

Aos amigos deste período rápido de mestrado, Guilherme Araújo, Tagliane Walker, Anderson Webler, Juliano Stumm, Thainá Fogliatto, Mariana Poll e tantos outros que a Universidade me proporcionou conhecer.

Ao grupo de pesquisa do departamento de pesquisa de Colheita, Armazenamento e Qualidade de Frutas do Centro de Competência em Fruticultura - Lago de Constança, em Ravensburg, Alemanha (KOB), Berenice Vollmar, Sabine Scheer, Sabine Sonntag, Christina

Stephan, Rachael Wood, Manaswi Hoovana, Kartik Khera, Aishwarya Patrudkar por toda ajuda, amizade e confiança prestada.

À Hans-Jürgen, Cristina, Joana e Joaquim, que também são minha família aqui na Alemanha. Obrigado pelo acolhimento de sempre.

Ao Bio-Obsthof, de Nikolaus Glocker e família, pela cedência da estrutura para montagem de parte dos trabalhos.

À Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), pelos 7 anos de formação que esta Instituição pública, gratuita e de qualidade me proporcionou.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Agricultura e Ambiente (PPGAAA), assim como à CAPES pela concessão da bolsa.

À todos os professores por todo o conhecimento compartilhado. E aos colegas do PPGAAA, pela convivência e troca de experiências.

Ao KOB, pelo apoio e acolhimento em todo este tempo. Me sinto em casa nesta Instituição.

Enfim, a todos familiares, amigos, colegas e professores que de alguma forma contribuíram e participaram da minha formação. Sou grato a todos vocês, com quem eu aprendi a me tornar não somente um melhor profissional, mas em primeiro lugar, uma melhor pessoa.

Meu muito obrigado!!!

*“Você ganha força, coragem e confiança
através de cada experiência que você
realmente para e encara o medo de
frente.”*

Eleanor Roosevelt

RESUMO

MÉTODOS ALTERNATIVOS NO CONTROLE DE PODRIDÕES DE MORANGO E MAÇÃ

AUTOR: Ricardo Bauer Pilla
ORIENTADORA: Denise Schmidt

O presente trabalho foi dividido em três artigos. Para o primeiro artigo, avaliou-se o efeito fungitóxico dos óleos essenciais (OE) de *Aloysia citriodora*, *Aloysia hatschbachii*, *Lippia alba*, *Cymbopogon winterianus*, *Cymbopogon martinii*, *Corymbia citriodora* e *Eucalyptus grandis*, nas concentrações de 0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5 $\mu\text{l.mL}^{-1}$ em meio BDA, em placas de petri inoculadas no centro com disco micelial, com o patógeno *Rhizopus oryzae*, causador de podridão mole em morangos. A composição química dos óleos foi identificada. Avaliações de crescimento fúngico foram realizadas durante período de 10 dias. Os óleos essenciais de *A. citriodora*, *C. martinii*, *L. alba* e *E. grandis*, apresentam efeito inibitório no desenvolvimento fúngico in vitro nas concentrações de 1,5; 2,0; 2,0 e 2,5 $\mu\text{l.mL}^{-1}$. Quando os óleos essenciais foram aplicados no teste in vivo em morangos, não foi observado a mesma sincronia dos resultados obtidos no teste in vitro. No segundo artigo, óleos essenciais de *Aloysia citriodora*, *Aloysia hatschbachii*, *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon martinii* e *Cymbopogon winterianus* foram testados in vitro e in vivo contra o patógeno *Penicillium expansum*, causador da podridão bolor azul em maçãs. Concentrações de 0,0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 $\mu\text{l.mL}^{-1}$ de OE em meio BDA, foram testadas em placas de petri inoculadas no centro com disco micelial do patógeno *P. expansum*. Os óleos essenciais de *A. citriodora*, *C. citratus*, *C. martinii* apresentaram efeito inibitório na concentração de 0,8 $\mu\text{l.mL}^{-1}$, enquanto *C. winterianus* e *A. hatschbachii* nas concentrações de 1,0 e $> 1,0$ $\mu\text{l.mL}^{-1}$. Quando avaliado a ação dos OE em frutos de maçã, o óleo essencial de *C. martinii* apresentaram a menor Área Abaixo da Curva de Progresso de Doença (AACPD), diferindo-se estatisticamente do tratamento controle e não diferindo-se do tratamento com fungicida Cercobin®, apresentando assim taxa de eficiência de controle aproximadamente em 30%. No terceiro artigo, maçãs 'Topaz' produzidas de forma orgânica foram submetidas a tratamento térmico somente com água quente ou com adição de cloreto de cálcio a 8 e 12% de concentração ou adição de bicarbonato de sódio a 4% de concentração; tratamento com três óleos essenciais e ainda tratamento com fungicida Pyrimethanil e armazenados em armazenamento refrigerado (AR) e atmosfera controlada (AC) pelo período de 4 e 6 meses, respectivamente. O tratamento água quente mais adição de cloreto de cálcio em 8 e 12% mantiveram a firmeza da polpa dos frutos armazenados em AR e apresentaram entre si correlação positiva ($r=0,92$), no entanto desordens fisiológicas foram observadas. O tratamento térmico mais bicarbonato de sódio apresentaram os menores índices de podridão, porém características indesejáveis como redução da firmeza da polpa e frutos com aspectos murchos foi o principal efeito negativo observado, seguido de frutos com necroses. Tratamentos com óleos essenciais apresentaram fitotoxicidade, o que conduziu a intensa podridão dos frutos, principalmente em AR. Já os tratamentos água quente e tratamento com fungicida reduziram a incidência de podridões e mantiveram a qualidade dos frutos durante o armazenamento.

Palavras-chave: Compostos aromáticos, *Fragaria x Ananassa*, *Malus domestica*, podridão, *Rhizopus oryzae*, *Penicillium expansum*, óleos essenciais, tratamento térmico, cloreto de cálcio, bicarbonato de sódio, atmosfera controlada, armazenamento refrigerado.

ABSTRACT

ALTERNATIVE METHODS IN THE CONTROL OF STRAWBERRY AND APPLE ROTS

AUTHOR: Ricardo Bauer Pilla

ADVISOR: Denise Schmidt

The present work was divided into three articles. For the first article, essential oils (EO) of *Aloysia citriodora*, *Aloysia hatschbachii*, *Lippia alba*, *Cymbopogon winterianus*, *Cymbopogon martinii*, *Corymbia citriodora* and *Eucalyptus grandis* were tested at concentrations of 0.0; 0.5; 1.0; 1.5; 2.0 and 2.5 $\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ of EO in PDA medium, in petri dishes inoculated in the centre with mycelial disc of the pathogen *Rhizopus oryzae*, causing soft rot in strawberries. The chemical composition of the oils was identified. Fungal growth evaluations were carried out during a period of 10 days. The essential oils of *A. citriodora*, *C. martinii*, *L. alba* and *E. grandis*, showed inhibitory effect on fungal development in vitro at concentrations of 1.5; 2.0; 2.0 and 2.5 $\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$. When the essential oils were applied in the in vivo test on strawberries, the same synchrony of the results obtained in the in vitro test was not observed. In the second article, essential oils of *Aloysia citriodora*, *Aloysia hatschbachii*, *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon martinii* and *Cymbopogon winterianus* were tested in vitro and in vivo against the pathogen *Penicillium expansum*, the cause of blue mold rot in apples. Concentrations of 0.0; 0.2; 0.4; 0.6; 0.8 and 1.0 $\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ of EO in PDA medium were tested on petri dishes inoculated in the centre with mycelial disc of the pathogen *P. expansum*. The essential oils of *A. citriodora*, *C. citratus*, *C. martinii* showed inhibitory effect at the concentration of 0.8 $\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$, while *C. winterianus* and *A. hatschbachii* at the concentrations of 1.0 and $> 1.0 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$. When evaluated the action of EOs on apple fruits, the essential oil of *C. martinii* presented the lowest Area Below Disease Progress Curve (ABDPC), differing statistically from the control treatment and not differing from the treatment with fungicide Cercobin®, thus presenting control efficiency rate approximately at 30%. In the third article, organically grown Topaz apples were heat treated with hot water alone or with calcium chloride at 8 and 12% concentration or sodium bicarbonate at 4% concentration; three essential oils and Pyrimethanil fungicide and stored in regular air (RA) and controlled atmosphere (CA) for 4 and 6 months, respectively. The hot water treatment plus addition of calcium chloride at 8 and 12% maintained the firmness of the pulp of fruits stored in RA and showed a positive correlation among themselves ($r=0.92$), however physiological disorders were observed. The thermal treatment plus sodium bicarbonate presented the lowest rot indexes, however undesirable characteristics such as reduction of pulp firmness and fruits with wilted aspects was the main negative effect observed, followed by fruits with necroses. Treatments with essential oils presented phytotoxicity, which led to intense fruit rot, mainly in RA. The treatments with hot water and fungicide reduced the incidence of rotting and maintained the quality of the fruits during storage.

Keywords: Aromatic compounds, *Fragaria x Ananassa*, *Malus domestica*, decay, *Rhizopus oryzae*, *Penicillium expansum*, essential oils, heat treatment, calcium chloride, sodium bicarbonate, controlled atmosphere, refrigerated storage.

LISTA DE FIGURAS

REFERENCIAL TEÓRICO

- Figura 1 – A) Morangos cobertos com estrutura fúngica do patógeno *Rhizopus oryzae*, como causador da podridão mole. B) Colônia fúngica de *Rhizopus oryzae* em meio de cultura BDA..... 19
- Figura 2 – A) Maçã com podridão bolor azul, com exteriorização dos sinais no centro da podridão. B) Colônia fúngica de *Penicillium expansum* em meio de cultura BDA.... 22

ARTIGO 1

- Figura 1 – Mycelial growth rate index (MGRI) of *R. oryzae* under the action of essential oils of *Aloysia hatschbachii* (A), *Aloysia citriodora* (B), *Corymbia citriodora* (C), *Cymbopogon martinii* (D), *Cymbopogon winterianus* (E), *Eucalyptus grandis* (F) and *Lippia alba* (G) in different concentrations. (Regression analysis at $p < 0.05$).. 41
- Figura 2 – Percentage of mycelial growth inhibition of *R. oryzae* under action of essential oils of *Aloysia hatschbachii* (A), *Aloysia citriodora* (B), *Corymbia citriodora* (C), *Cymbopogon martinii* (D), *Cymbopogon winterianus* (E), *Eucalyptus grandis* (F) and *Lippia alba* (G) in different concentrations. (Regression analysis at $p < 0.05$).. 42
- Figura 3 – In vitro inhibition of *Rhizopus oryzae* mycelial growth, 10 days after incubation with different concentrations of *Aloysia citriodora* essential oil.. 44
- Figura 4 – Result of the application of essential oil treatments on strawberries after three days of inoculation with the pathogen *R. oryzae*... 46
- Figura 5 – Disease index (%) of *R. oryzae* on strawberries after third day of inoculation with the pathogen, inoculated 1 h before treatments..... 46

ARTIGO 2

- Figura 1 – Porcentagem de Inibição do Crescimento Micelial - PIC (%), Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM), nas seis concentrações dos óleos essenciais de *Aloysia citriodora* (A), *Aloysia hatschbachii* (B), *Cymbopogon citratus* (C), *Cymbopogon martinii* (D) e *Cymbopogon winterianus* (E), submetidas à análise de regressão ($p > 0,05$) ... 66
- Figura 2 – Inibição in vitro do crescimento micelial de *Penicillium expansum*, 10 dias após incubação com diferentes concentrações do óleo essencial de Palmarosa (*C. martinii*) e com o fungicida Cercobin®..... 67

Figura 3 – Área abaixo da curva de progresso de doença (AACPD) e eficácia do controle (%) em frutos de maçãs tratados com diferentes tratamentos.	71
Figura 4 – Inibição da podridão bolor azul em maçãs Fuji inoculadas com o patógeno <i>Penicillium expansum</i> , 4 dias e 6 dias, respectivamente, após a aplicação de diferentes tratamentos....	72

ARTIGO 3

Figura 1 – Firmeza da polpa de maçãs 'Topaz' submetidas em diferentes tratamentos, em duas condições de armazenamento, após sete dias de prateleira a 20 °C.	85
Figura 2 – Relação Potássio/ Cálcio (K/Ca) – Figura 2.A e concentração de cálcio (mg.Ca.100g ⁻¹ de massa fresca) – Figura 2.B, conforme análise mineral do tecido de maçãs 'Topaz' após armazenamento refrigerado.	86
Figura 3 – Incidência final de podridão dos frutos em porcentagem (%) após período de armazenamento e sete dias de prateleira a 20°C.. ..	88
Figura 4 – Índice de doença dos frutos conforme tratamento após período de armazenamento dos frutos. Linhas sobre cada coluna no gráfico indicam valores de desvio padrão por tratamento.	89
Figura 5 – Porcentagem de frutos saudáveis, podridões e demais desordens fisiológicas externas em maçãs 'Topaz' submetidas em armazenamento em atmosfera controlada e após sete dias de prateleira em ambiente com temperatura de 20°C.....	90
Figura 6 – Frutas com massa pulverulenta branca (resíduos do tratamento com cálcio nos frutos) (A) e corrosão no pedúnculo dos frutos causados pelos tratamentos com adição de cloreto de cálcio (B).	90
Figura 7 – Frutas com corrosão na região do pedúnculo e do cálice em tratamentos com bicarbonato de sódio.. ..	91
Figura 8 – Podridão intensa em tratamento com maçãs 'Topaz' (A) causada pela aplicação de óleo essencial por método de imersão e região do cálix dos frutos com fitotoxidade (B).	92

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Tabela 1 -	Identification and quantification of the five major chemical components in the essential oils of <i>Aloysia citriodora</i> (A), <i>Aloysia hatschbachii</i> (B), <i>Corymbia citriodora</i> (C), <i>Cymbopogon martinii</i> (D), <i>Cymbopogon winterianus</i> (E), <i>Eucalyptus grandis</i> (F), <i>Lippia alba</i> (G) and Kovats index (IK).....	40
Tabela 2 –	Regression equations, ED50 values in $\mu\text{l.mL}^{-1}$ (inhibitory concentration of 50% of mycelial growth), minimum inhibitory concentration in $\mu\text{l.mL}^{-1}$ (MIC), fungicide effect and respective doses, when found.	44
Tabela 3 –	Concentration of spores ($10^3.\text{mL}^{-1}$) as a function of the doses of the different essential oils studied and respective regression equation, submitted to variance analysis at 5% probability.	45

ARTIGO 2

Tabela 1 –	Identificação e quantificação dos componentes químicos nos óleos essenciais de <i>Aloysia citriodora</i> (A), <i>Aloysia hatschbachii</i> (B), <i>Cymbopogon citratus</i> (C), <i>Cymbopogon martinii</i> (D), <i>Cymbopogon winterianus</i> (E) e índice de Kovats (IK).....	63
Tabela 2 -	Equações de regressão, valores de ED50 em $\mu.\text{ml}^{-1}$ (concentração inibitória de 50% do crescimento micelial), concentração mínima inibitória em $\mu\text{l.mL}^{-1}$ (MIC), efeito fungicida e respectivas doses, quando encontrado.....	68
Tabela 3 –	Concentração de esporos ($10^4.\text{mm}^{-2}$) em função das doses dos diferentes óleos essenciais estudados e respectiva equação de regressão, submetida a análise de variância a 5% de probabilidade.	70
Tabela 4 –	Acidez titulável (% ácido málico) e sólidos solúveis totais – SST ($^{\circ}\text{Brix}$) em maçãs cultivar “Fuji” nos diferentes tratamentos, submetidos ao teste estatístico Skott-knott, a 5% de probabilidade de erro.....	73

ARTIGO 3

Tabela 1 –	Atributos de qualidade de maçãs ‘Topaz’ submetidas em diferentes tratamentos, em duas condições de armazenamento, após sete dias de prateleira a 20°C	84
Tabela 2 -	Conteúdo mineral dos frutos submetidos em armazenamento refrigerado, dos componentes minerais Ca, Mg, K, P e Relação K/Ca.....	86
Tabela 3 –	Resultados das análises de resíduos dos frutos tratados com fungicida Pembrotec® (P.A. Pyrimethanil) e da solução em que os frutos foram tratados, em três diferentes momentos: início da aplicação, após aplicação e após neutralização da solução.....	92

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO TEÓRICA.....	17
2.1 MORANGO	17
2.2 MAÇÃ	17
2.3 DOENÇAS PÓS-COLHEITA EM FRUTAS	18
2.3.1 <i>Rhizopus oryzae</i> e podridão mole em morangos.....	19
2.3.2 <i>Penicillium expansum</i> e Bolor Azul em maçãs.....	20
2.4 MÉTODOS DE CONTROLE DE DOENÇAS PÓS-COLHEITA EM FRUTOS.....	22
2.4.1 Óleos Essenciais	22
2.4.2 Tratamento Térmico com Água Quente.....	27
2.4.3 Tratamento com cálcio na pós-colheita.....	29
2.4.4 Tratamento com sódio na pós-colheita.....	30
2.4.5 Armazenamento em ambiente refrigerado e atmosfera controlada.....	30
3 ARTIGO 1 - RHIZOPUS ORYZAE AS A CAUSE OF POST-HARVEST ROT IN STRAWBERRIES AND EVALUATION OF THE USE OF ESSENTIAL OILS IN IN VITRO AND IN VIVO FUNGAL CONTROL.....	32
3.1 INTRODUCTION.....	32
3.2 MATERIAL AND METHODS	33
3.2.1 Place where the experiments will be carried out.....	34
3.2.2 Obtaining fungal isolate	34
3.2.3 Obtaining the essential oils	34
3.2.4 Determination of essential oil concentrations on fungal development and spore production.....	35
3.2.5 Assessments of fungitoxic potential <i>in vitro</i>	36
3.2.6 Selection of essential oils and <i>in vivo</i> test on strawberry postharvest.....	37
3.2.7 Disinfestation and inoculation of pseudo fruit	37
3.2.8 Application of essential oil treatments on pseudo fruit.....	37
3.2.6 Assessment of fungal infection	38
3.3 RESULTS.....	39
3.3.1 Composition of essential oils	39
3.3.2 <i>In vitro</i> tests.....	39
3.3.3 <i>In vivo</i> tests.....	45
3.4 DISCUSSION	47
3.5 CONCLUSION	49
BIBLIOGRAPHIC REFERENCES	50

4. ARTIGO 2 - ÓLEOS ESSENCIAIS PODEM CONTRIBUIR NO CONTROLE DE PODRIDÃO BOLOR AZUL EM MAÇÃS?	54
4.1 .INTRODUÇÃO	55
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	56
4.2.1 Local de realização dos experimentos e obtenção do isolado e óleos essenciais....	56
4.2.2 Obtenção do isolado	57
4.2.3 Extração do óleo essencial e composição química.....	57
4.2.4 Testes <i>in vitro</i>	58
4.2.5 Teste <i>in vivo</i> na pós-colheita de maçãs	60
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
4.4 CONCLUSÃO	73
5. ARTIGO 3 - CONTROLE DE PODRIDÕES PÓS-COLHEITA DE MAÇÃS 'TOPAZ' EM DIFERENTES TECNOLOGIAS DE ARMAZENAMENTO	79
5.1 INTRODUÇÃO	80
5.2 MATERIAL E MÉTODOS	81
5.3 RESULTADOS	83
5.4 DISCUSSÃO.....	93
5.5 CONCLUSÃO	95
6. DISCUSSÃO GERAL	98
7. CONCLUSÃO GERAL	100
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101

1. INTRODUÇÃO

Anualmente doenças pós-colheita de frutas geram perdas econômicas significativas tanto para produtores como para comercializadores (DUTOT; NELSON; TYSON, 2013), estimando-se perdas anuais de até 50% conforme a cultura, nos países em desenvolvimento (JANISIEWICZ; KORSTEN, 2002).

Frutas e vegetais frescos são altamente propensos à rápida decomposição, o que também pode estar associado a riscos à saúde dos consumidores (KABELITZ et al., 2019). Micotoxinas podem ser produzidas e conduzir a intoxicações humanas, a exemplo da micotoxina patulina, produzida pelo patógeno *Penicillium expansum*, causador da podridão bolor azul em maçãs (MENDES et al., 2016).

Na cultura da maçã, podridões causadas pelos patógenos *Neofabrea* spp. e *Penicillium expansum* são mencionadas como as principais causadoras de perdas na pós-colheita (NEUWALD; KITTEMANN, 2016; WASSERMANN et al., 2019), podendo as doenças pós-colheita iniciar no campo, durante a formação do fruto, ou surgirem depois da colheita, com a maturação fisiológica (SENHOR et al., 2009).

Na cultura do morango, os patógenos *Rhizopus* sp. e *Botrytis cinerea* destacam-se como os principais causadores de podridões pós-colheita, podridões facilitadas pelas características do pseudofruto, como as altas taxas respiratórias e revestimento do pseudofruto por uma fina e frágil membrana, havendo portanto ausência de camadas de revestimento resistentes, como aquelas que se observam em frutos como da maçã (BEDENDO, 2018; BRAKMANN et al., 2011; SIQUEIRA et al., 2009).

A fim de controlar tais doenças na pós-colheita, diferentes métodos de controle se aplicam de forma única ou integrada visando prolongar o tempo de armazenamento e a vida de prateleira dos produtos (SENHOR et al., 2009). Tratamentos com fungicidas químicos são os mais comuns na atualidade, no entanto pressão de seleção de patógenos resistentes pode ocorrer com maior intensidade na ausência de outros métodos de controle, perdendo o produto sua eficácia e utilidade ao longo do tempo.

Portanto, possuir uma gama maior de estratégias de controle de podridões na conservação de frutas é de interesse de toda a cadeia produtiva, fortalecendo assim o combate a podridões na pós colheita.

Na atualidade, produtos vegetais como os óleos essenciais ganham destaque em diversas pesquisas que verificaram seu efeito fungitóxico e/ou elicitador também na conservação de frutas (SCHAHO et al., 2013; VIEIRA et al., 2018; WEI et al., 2018). Singh e Dwivedi (2018) salientam

que os óleos essenciais são fontes de metabólitos secundários, os quais estão diretamente relacionados com mecanismos de defesa das plantas.

Outros métodos, como o tratamento dos frutos de maçã com imersão em água quente foi relatado como uma ferramenta eficiente no controle de podridões durante o armazenamento e que manteve a qualidade dos frutos (SCHIRRA et al., 2000; KABELITZ et al., 2019; MAXIN et al., 2012). Aplicação pós-colheita de cloreto de cálcio foi relatada por aumentar o período de armazenamento dos frutos (SAMS et al., 1993). Diminuição da respiração e manutenção da firmeza dos frutos também foram observados por Kittermann et al. (2010). Aplicação de sais de sódio foram utilizados em maçãs com o objetivo de avaliar o controle de patógenos (TIRYAKI, 2014). Guan e Fan (2010) observaram que associações de sais de sódio e cálcio inibiram o escurecimento de tecidos em maçãs, manteve a firmeza e reduziu a população microbiana.

Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi de avaliar a aplicação de óleos essenciais no controle *in vitro* e *in vivo* do patógeno causador de podridão pós-colheita em morango, *Rhizopus oryzae*, e do patógeno *Penicillium expansum*, em maçãs, assim como verificar o efeito de diferentes tratamentos na manutenção da qualidade dos frutos e no controle de podridões em maçãs ‘Topaz’ conservadas em diferentes condições de armazenamento.

2. REVISÃO TEÓRICA

2.1 MORANGO

O morango (*Fragaria x ananassa* Duch.), pertencente à família das Rosaceae, destaca-se por ser um fruto muito apreciado em praticamente todo o mundo devido suas propriedades nutritivas e de sabor agradável. Caracteriza-se por apresentar alta perecibilidade e também por ser não climatérico, sendo a colheita necessária na sua máxima maturação para que as características organolépticas desejadas sejam atingidas (HERNÁNDEZ-MUNÓZ et al., 2008). Siqueira et al. (2009) completam que o morango possui alta taxa respiratória e um substrato úmido, rico em ácidos e açúcares, que favorece o desenvolvimento de patógenos. Além do mais, o pseudofruto é envolto apenas por uma camada fina de epiderme, o que o deixa mais suscetível a perda de água, fermentos e conseqüentemente ao ataque de patógenos.

Podridões fúngicas são uma das maiores limitações na vida de prateleira de morangos, podendo-se destacar *Botrytis cinérea*, *Penicillium digitatum* e *Rhizopus stolonifer* como os patógenos mais recorrentes causadores de podridões em morangos (BAUTISTA-BAÑOS, 2003).

2.2 MAÇÃ

A maçã (*Malus domestica* Borkh.) é uma espécie pertencente a família Rosaceae, subfamília Pomoidae, das quais pertence frutos caracterizados por apresentar dois a cinco carpelos fechados com cobertura carnuda (MUSACCHI; SERRA, 2018), sendo caracterizado ainda por apresentar um tipo de amadurecimento climatérico, uma vez que a maioria das alterações fisiológicas relevantes são desencadeadas e regidas pela ação do etileno mesmo que o fruto não esteja mais ligado a planta mãe (BUSATTO et al., 2017).

As frutas são protegidas superficialmente por camada de cutícula, a qual é composta de ceras epicuticulares; tal proteção auxilia o fruto contra danos causados por pressões ambientais, tais como o vento, radiação solar, desidratação e também a entrada de agentes patogênicos causadores de podridão no fruto (BELDING et al., 1998).

Um dos desafios econômicos para a cultura é as podridões que acometem os frutos após a colheita. No norte da Europa, as podridões mais comuns são a podridão olho de boi, causado por *Neofabraea* spp., syn. *Gloeosporium*, a podridão amarga por *Colletotrichum* spp., a podridão castanha por *Monilinia fructigena*, o bolor cinzento causado por *Botrytis cinérea*; podridão de Fusarium por várias espécies de *Fusarium*, podridão do bolor azul causada por

Penicillium expansum; sendo a incidência dos agentes causais passíveis de variações em função da cultivar, do clima durante a época de cultivo e das práticas agrícolas. (GRANTINA-IEVINA, 2017).

2.3 DOENÇAS PÓS-COLHEITA EM FRUTAS

O Brasil é um grande produtor de frutas, ocupando o terceiro lugar no mundo em produção e o 23º lugar nas exportações, as quais possuem apostas positivas para os próximos anos, onde se busca ultrapassar as exportações registrados no ano de 2008 (ANUÁRIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 2018). No entanto, uma das problemáticas na cadeia produtiva de frutas refere-se às perdas pós-colheita, as quais são causadas, em grande parte, pelo ataque de patógenos.

Após a colheita, apesar das frutas serem separadas da planta mãe, o processo de respiração é continuado e uma série de transformações metabólicas no fruto refletem em perda de turgidez dos tecidos, desidratação, perda de massa, alterações de textura e coloração; tais transformações tornam os frutos mais predispostos ao ataque de patógenos, potencializado com a presença de injúrias mecânicas, comum de ocorrer durante os processos de colheita e pós-colheita (SANTOS FILHO et al., 2014).

As doenças pós-colheita podem surgir ainda no campo, durante a formação do fruto ou depois da colheita, com a maturação fisiológica (SENHOR et al., 2009). Os agentes fitopatogênicos, muitas vezes quiescentes, geram grandes prejuízos a toda cadeia produtiva de frutas, tendo em vista que os sintomas das doenças são expressos somente após a colheita, durante os processos de transporte e armazenamento, quando possuem condições ambientais favoráveis ao desenvolvimento, acarretando em sérios prejuízos econômicos e comprometendo até mesmo acordos comerciais (TERAO; BATISTA; BARBOSA, 2013).

Os fungos são responsáveis por 80 a 90% das doenças pós-colheita. Os principais gêneros causadores de doenças pós-colheita em frutos e hortaliças são *Alternaria*, *Botrytis*, *Botryosphaeria*, *Colletotrichum*, *Diplodia*, *Monilinia*, *Penicillium*, *Phomopsis*, *Rhizopus* e *Sclerotinia* e os bacterianos, *Pectobacterium* e *Pseudomonas* (PARISE et al., 2015).

A carência no transporte e armazenamento refrigerado na cadeia frutífera, assim como manipulação inadequada e tratamentos fitossanitários com baixa eficácia, também refletem nas inúmeras perdas quantitativas e qualitativas na pós-colheita de frutas (VENTURA et al., 2007 *apud* SILVA; VIECELLI; TERAQ, 2014).

2.3.1 *Rhizopus oryzae* e podridão mole em morangos

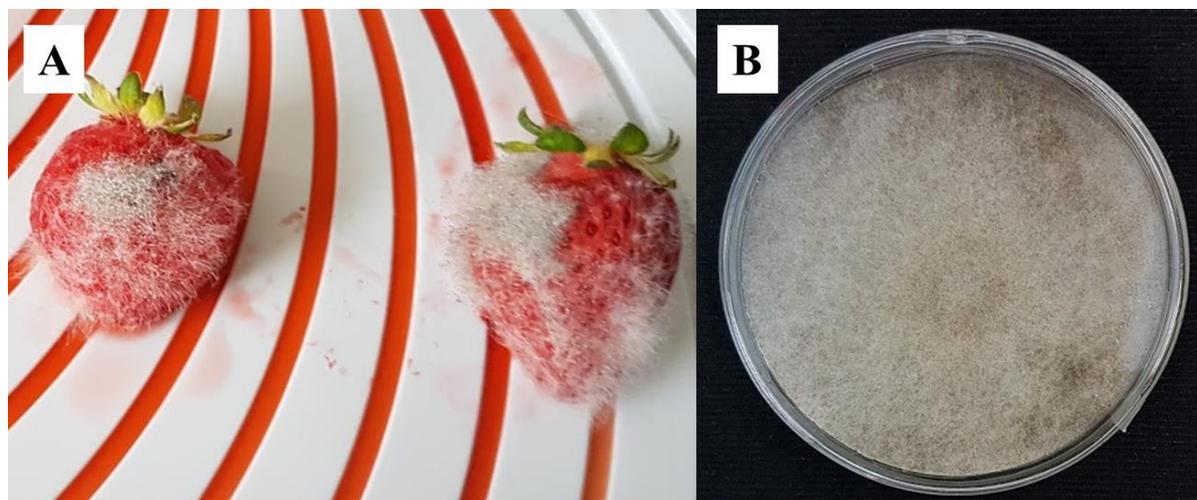
O gênero *Rhizopus* sp. é responsável por inúmeras podridões de órgãos de reserva, ocorrendo tanto em frutas, legumes e até mesmo raízes. Dentre as inúmeras culturas afetadas, destaca-se a podridão mole em morangos, considerada a mais importante podridão pós-colheita para a cultura e como principal agente causal, a espécie *Rhizopus stolonifer* (BEDENDO, 2018). A podridão mole dificilmente manifesta sintomas a campo, os sintomas costumam ser expressos após a colheita, comprometendo completamente a qualidade do produto ofertado.

Outra espécie do gênero que se destaca é o patógeno *Rhizopus oryzae*, o qual é caracterizado por ser um fungo filamentososo, conhecido principalmente como produtor de ácido láctico e reportado como patógeno pós colheita (UYAR; UYAR, 2019).

Nos últimos anos o patógeno foi reportado pela primeira vez como causador de podridão pós-colheita em diversas culturas, como pera, maçã, melancia e banana (KHOKHAR et al., 2019 (a); KHOKHAR et al., 2019 (b); KNOW et al., 2014 (a); KNOW et al., 2012). No entanto, apenas um relato foi encontrado na literatura científica, de ocorrência do patógeno em pseudofrutos de morango, o qual foi observado na Coreia (KNOW et al., 2014 (b)).

A podridão causada por este fungo destaca-se por apresentar inicialmente alterações na coloração do fruto, acompanhado de podridão mole de aspecto aquoso com escorrimento de suco, que em condições de alta umidade apresenta desenvolvimento de micélio denso e branco, acompanhado pelas estruturas reprodutivas do patógeno, de caráter cinzento e em forma de tufos (esporangióforos com esporângios) (KNOW et al., 2014 (b)). Tais características podem ser observadas na Figura 1A.

Figura 1 - A) Morangos cobertos com estrutura fúngica do patógeno *Rhizopus oryzae*, como causador da podridão mole. B) Colônia fúngica de *Rhizopus oryzae* em meio de cultura BDA.



Segundo Bedendo (2018), *Rhizopus* sp. é caracterizado por apresentar micélio bem desenvolvido, hifas não-septadas, rizoides - que realizam a fixação da hifa ao substrato e esporangióforos longos que sustentam esporângios de coloração escura, os quais diferenciam-se e dão origem aos esporangiósporos, que quando liberado pelo rompimento dos esporângios, possuem a capacidade de germinar, formar novas hifas, ramificações e novo micélio.

O patógeno *Rhizopus* sp. sobrevive em restos culturais ou no solo, e após infecção dos frutos, os esporos produzidos são facilmente disseminados pelo ar ou insetos (JANAKA et. al., 1997). Conforme Passaglia (2017) o patógeno ataca inúmeras culturas, ou seja, possui especialidade baixa quanto ao hospedeiro, com alta capacidade de dano, e de forma saprofítica. O patógeno realiza a infecção nos hospedeiros, principalmente a partir de ferimentos, realizados nos tratos culturais, processos de colheita, transporte, beneficiamento e outros.

Bedendo (2018), explica que após o fungo realizar o processo de infecção, as hifas, a partir da ação de enzimas próprias, iniciam o processo de colonização dos tecidos, digerindo substâncias pécticas que constituem a lamela média; em seguida ocorre o rompimento das células e o extravasamento celular, decorrido da ação de enzimas pectolíticas e celulolíticas, as quais são responsáveis pela decomposição da lamela média e das paredes celulares. Segundo o mesmo autor, a colonização é continuada com a decomposição das células mortas, que serão fontes de nutrientes para o desenvolvimento do patógeno, tanto internamente, como externamente no hospedeiro, onde haverá a emissão das estruturas de reprodução.

2.3.2 *Penicillium expansum* e Bolor Azul em maçãs

O agente patogênico *Penicillium expansum* é o agente responsável pela podridão pós-colheita conhecida como bolor azul, que acomete gravemente frutos em armazenamento como maçã, pêsego e pera.

O fungo é um organismo de ampla ocorrência e considerado uma das principais preocupações da cadeia alimentar global, pois além de ser agente causal de podridões pós-colheita, possui também capacidade de produzir várias micotoxinas, dentre elas a patulina, relativamente menos discutida na literatura quando comparada com outras micotoxinas de origem alimentar, porém sendo como um dos principais fatores de perda econômica de vegetais e frutas (TANNOUS et al., 2017).

Na cultura da maçã, o patógeno *Penicillium expansum*, causador da podridão bolor azul na pós-colheita, é considerado um agente patológico de grande importância (FRISVAD; SAMSON, 2004).

Caracteriza-se por ser um patógeno necrotrófico, de alta agressividade, encontrando condições adequadas para a germinação de seus conídios em pontos de ferimentos (causados na colheita, transporte e demais processos de manuseio), através das lenticelas ou na região do pedúnculo (MENDES et al., 2016).

A podridão do patógeno apresenta sintomas típicos de coloração marrom pálida e de forma circular concêntrica, que se espalham rapidamente pela superfície e profundamente no interior da fruta (TANNOUS et al., 2017), com capacidade ainda de alteração das características organolépticas do fruto, devido a produção da micotoxina patulina (MENDES et al., 2016). As lesões tornam-se flácidas devido à perda de suco celular, sendo recobertas de frutificação conidiófora do patógeno, de coloração verde-azulada (Figura 2 A e B), motivo da nomeação da podridão bolor azul (DONATI, 2008).

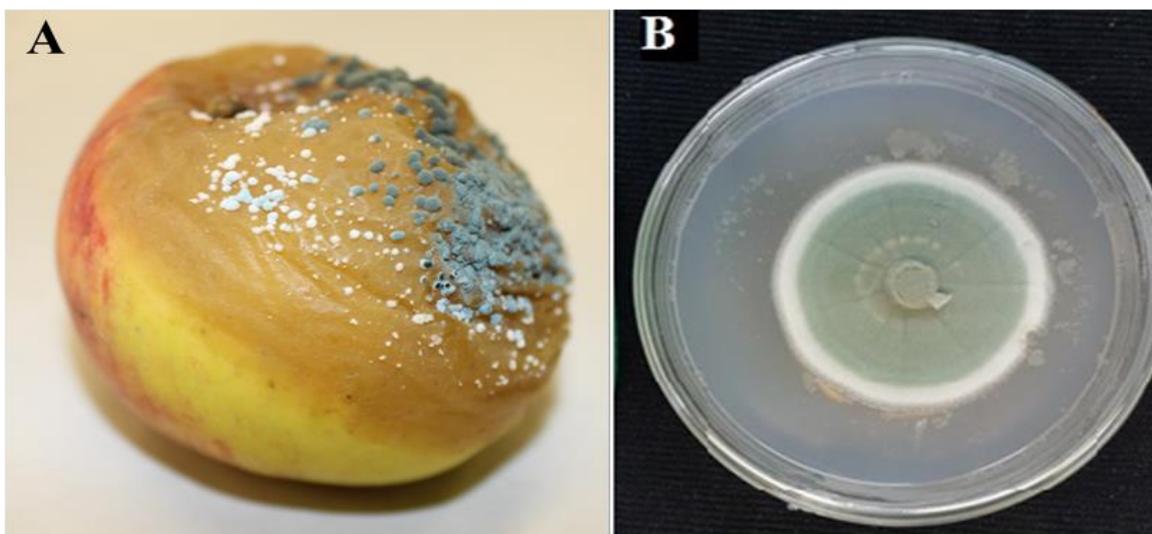
O patógeno se desenvolve mesmo em condições de temperatura baixas, características de câmara fria, porém com desenvolvimento reduzido. Panasenko (1967) apresenta as temperaturas cardinais da espécie, sendo a temperatura mínima de apenas -3 °C, ótima de 25 a 26 °C e temperaturas máximas na faixa de 33 a 35 °C.

Na faixa de temperatura de 20 a 25 °C ocorre desenvolvimento abundante, e com presença de alta umidade relativa do ar, há exteriorização dos sinais na lesão do fruto, de aspecto mofoso pulverulento, primeiro de coloração branca, e após esporulação, verde-azul (DONATI, 2008). Tais estruturas são possíveis de serem visualizadas em estágios mais avançados da podridão, como pode ser observado na Figura 2A.

Com a produção das estruturas reprodutivas (conídios), os frutos afetados pelo patógeno tornam-se uma importante fonte de inóculo, além do mais o patógeno vive saprofiticamente dos resíduos vegetais em diversas superfícies, como embalagens ou ao longo das câmaras frigoríficas, sendo o ar um dos meios propagativos do inóculo (DONATI, 2008).

Rocha Neto e Di Piero (2013), em estudo visando alternativas para o controle do bolor azul em maçãs, salientam que muitas vezes a fonte de inóculo do patógeno é aumentada e infecta outros frutos no momento da lavagem e classificação dos frutos, pois a água ou solução de lavagem é poucas vezes, se não nula, renovada, o que ao invés de atenuar as infecções, acaba aumentando as infecções de frutos feridos. Esses autores destacam ainda, como medidas de controle para o bolor azul, o emprego de diferentes produtos à base de cloro ou mesmo fungicidas registrados à base de iprodione ou do grupo dos benzimidazóis.

Figura 2 - A) Maçã com podridão bolor azul, com exteriorização dos sinais no centro da podridão. B) Colônia fúngica de *Penicillium expansum* em meio de cultura BDA.



Fonte: Autoria própria, 2020.

Na Itália, os únicos compostos químicos permitidos para o controle pós-colheita do bolor azul são os benzimidazóis, no entanto tem se observado populações de patógenos resistentes a estes fungicidas, limitando a eficiência do controle de doenças fúngicas pós-colheita (BARALDI et al. 2003).

2.4 MÉTODOS DE CONTROLE DE DOENÇAS PÓS-COLHEITA EM FRUTOS

Além do controle químico, vários métodos de controle de podridões em frutos, vem sendo testados e/ou utilizados, como o biocontrole, armazenamento refrigerado, atmosfera controlada e modificada, indução de resistência, uso de óleos essenciais e de extratos vegetais (MAZARO et al., 2007), tratamento com água quente (KABELITZ et al., 2019), sais de sódio e cálcio (SAMS et al., 1993; TIRYAKI, 2014).

Alguns destes métodos são relatados a seguir, tendo em vista que os mesmos fizeram parte dos tratamentos em algum momento deste trabalho.

2.4.1 Óleos Essenciais

Desde a antiguidade até os dias de hoje, o uso de plantas medicinais e aromáticas tem sido utilizado pelas civilizações por possuírem características peculiares, variáveis conforme a

espécie, para uso em determinado fim, sejam elas na preparação de um chá diurético, afastamento de pragas, preparação de pomadas, essências para perfumes e cosméticos, aromatização de ambientes, dentre inúmeros outros exemplos que podem ser citados quando se refere a este assunto.

A utilização destes conhecimentos, estimuladas inicialmente e por séculos pelo conhecimento empírico, faz a ciência se interessar cada vez mais nas propriedades químicas vegetais, no intuito de desvendar e aprimorar o entendimento dos mecanismos fitoquímicos do produto.

Estas características peculiares, oriundas do metabolismo secundário das plantas, são sintetizadas para uma ampla defesa da própria espécie, seja contra patógenos ou em demais condições de estresse (DHIFI et al., 2016). Um destes metabólitos secundários são classificados como óleos essenciais ou simplesmente essências.

Os óleos essenciais poder ser definidos de forma geral, segundo Simões e Spitzer (2006), como misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, em sua maioria com características odoríferas, de forma líquida e aparência oleosa à temperatura ambiente, sendo a volatilidade dos óleos essenciais a principal característica que os diferencia dos óleos fixos, os quais são compostos de substâncias lipídicas obtidas geralmente a partir de sementes, como soja, milho e canola. Morais (2009) afirma que na maioria das vezes, os óleos essenciais apresentam odor agradável e marcante.

As características de volatilidade e insolubilidade em água e solubilidade em solventes orgânicos usuais é o que permitem caracterizá-los e realizar seu isolamento (SERAFINI et al., 2002).

A constituição química dos óleos essenciais é descrita por Wolffenbüttel (2019, p. 31) no seu livro “Base da Química dos Óleos Essenciais e Aromaterapia” -, da seguinte forma:

Em matéria de constituintes químicos, os óleos essenciais são formados quimicamente por estruturas de terpenos, sesquiterpenos, fenólicos, fenilpropanoicos, alifáticos não terpênicos, heterocíclicos; e funções químicas de álcoois, cetonas, aldeídos, ácidos carboxílicos, ésteres, óxidos, acetatos.

No entanto, Simões e Spitzer (2006) destacam que a grande maioria é composta quimicamente por derivados de fenilpropanóides ou de terpenos, sendo estes últimos os predominantes. Destacam ainda, que dentre a classificação dos terpenos, que são formados a partir de unidades de isopreno-9 com cinco carbonos cada, as classes que mais se destacam são

os monoterpenóides (cerca de 90% dos óleos voláteis) e os sesquiterpenos, formados por duas e três unidades de isopreno cada, respectivamente.

Os metabólitos classificados como terpenos são metabólitos secundários derivados da rota do mevalonato, enquanto os metabólitos compostos por fenilpropenos são derivados da rota do ácido chiquímico (CASTRO et al., 2004).

Por apresentarem estruturas terpênicas de menor massa molecular, os monoterpenos e sesquiterpenos apresentam saliente volatilidade, enquanto as moléculas dos di-, tri-, tetraterpenos apresentam baixa volatilidade, sendo as duas primeiras classes (di- e triterpenos), componentes principais de oleorresinas (basicamente composto por óleo essencial e resina) (FELIPE; BICAS, 2016).

Atualmente, têm-se conhecimento que cerca de 30.000 espécies são capazes de produzir óleo essencial, com composição variável de 10 a 100 diferentes componentes metabólicos; em média 150 deles podem ser encontrados no mercado (D'AGOSTINO et al., 2019).

As plantas podem produzir óleos essenciais em quantidade e composições variáveis, nas suas mais diferentes partes, desde sementes, raízes, rizomas, casca de frutos, folhas, ramos e até em pétalas de flores (WOLFFENBÜTTEL, 2019), onde são armazenados em estruturas secretoras externas, como tricomas glandulares, e estruturas internas, a exemplo de cavidades secretoras, idioplastos (FRANCO; ALBIERO, 2018) e canais secretores (LACCHIA; GUERREIRO, 2009).

Segundo Marotti et al. (1992) óleo essencial extraído de toda a planta de funcho (*Foeniculum vulgare* var. dulce), apresentou baixo conteúdo de trans-anetol, fenchone e estragol e altas concentrações de limoneno em comparação com o óleo essencial obtido a partir de suas sementes.

Os componentes e o rendimento dos óleos essenciais de uma mesma espécie podem variar conforme o ambiente de produção e práticas de cultivo à que estão submetidos (HUDAIB; ABURJAI, 2007). Além do mais, variações genéticas dentro da mesma espécie, chamadas de quimiótipos (CASTRO et al., 2004) também são responsáveis por diferenças em seus constituintes.

Em estudo de Veloso et al. (2014), com quatro acessos silvestres de manjeriço (*Ocimum basilicum* L.), oriundos de diferentes regiões geográficas e duas cultivares comerciais cultivadas sob mesmas condições edafoclimáticas, observou-se que os acessos silvestres tiveram como composto majoritário, o fenilpropanóide (E)-cinamato de metila, e os constituintes monoterpênicos linalol e 1,8-cineol, assim como o constituinte sesquiterpênico

estragol, como constituintes traços, enquanto nas duas cultivares comerciais estes foram os compostos majoritários.

2.4.1.1 Potencial uso de Óleos Essenciais na agricultura e conservação alimentícia

As propriedades antimicrobianas e elicitoras dos óleos essenciais e seus constituintes vêm sendo estudadas há anos e constituem como uma potencialidade para a utilização de tratamentos alternativos, na produção e conservação de alimentos.

Na visão de Rienth et al. (2019), os óleos essenciais, devido suas atividades antibacterianas, antivirais e antifúngicas, estão entre as alternativas mais promissoras de proteção natural às plantas. No entanto, pesquisas com estes produtos são necessárias para elucidar os efeitos, formas de aplicação, pontos positivos e negativos dos produtos.

Como produtos naturais, os óleos essenciais são destacados por diversos autores por apresentarem atividade tóxica a diversos agentes patogênicos causadores de doenças e injúrias na agricultura (SOYLI; KURT; SOYLI (2010), ANARUMA et al. (2009), NEGRINI et al. (2019)) assim como destacam as propriedades dos óleos essenciais como elicitores de mecanismos próprios de defesa na planta hospedeira, no combate de patogenicidades (JAMIOŁKOWSKA, 2020).

No entanto, a atividade biológica dos óleos essenciais é condicionada a sua composição química, que segundo Morais (2009) é determinada pelo genótipo e influenciada pelas condições ambientais e de manejo da cultura, como adubação, irrigação, colheita, e ainda podendo variar conforme o método de extração (WOLFFENBÜTTEL, 2019).

No combate fúngico, embora que os mecanismos precisos de ação ainda não estejam totalmente elucidados, um dos principais mecanismos existentes possui interação direta ou indireta com o principal esteroide presente nos fungos, o ergosterol (ZACCHINO, 2001), o qual é um dos componentes da membrana plasmática dos fungos e um bom indicador de crescimento fúngico (GALVÃO et al., 2003).

Conforme Zhou et al. (2017) em pesquisa com os componentes metabólicos purificados de óleos essenciais, carcravol e eugenol, no controle de *Rhizopus stolonifer* em podridão pós-colheita de frutos de pêssago, estes componentes causaram diminuição do conteúdo de ergosterol nos fungos, acarretando na ruptura das membranas celulares fúngicas e consequente vazamento citoplasmático das células, o que explica a inibição do desenvolvimento fúngico, *in vitro* e *in vivo*.

Os óleos essenciais atuam em vários níveis dependendo dos componentes e da concentração do óleo essencial (KRZYŚKO-ŁUPICKA; SOKÓŁ; PIEKARSKA-STACHOWIAK, 2020) sendo a membrana plasmática e a parede celular as mais frequentes relatadas em repetidos estudos, porém, não as únicas possíveis de serem afetadas, tendo em vista possíveis efeitos sobre mitocôndrias, retículo endoplasmático e também na expressão de genes responsáveis pela adesão, crescimento, dimorfismo, esporulação, etc (D'AGOSTINO et al. 2019). Além do mais, efeitos inibitórios nas ATPases da membrana e nas interações com citocinas e respiração celular, também são destacados, os quais levam à rápida depleção de energia e morte celular (SHREAZ et al. 2016).

Em estudo de Lambert et al. (2001) com óleo essencial de orégano mexicano (*Lippia graveolens*) e seus dois componentes majoritários, timol e carvacrol, contra bactérias patogênicas contaminantes de alimentos, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, os autores concluíram o efeito inibitório do óleo essencial em estudo e de seus componentes, atribuindo o controle a danos provocados na membrana celular fosfolipídica bacteriana, o que acarreta em desequilíbrio do pH e de íons inorgânicos.

Rodriguez-Garcia et al. (2016), também em estudo com o óleo essencial de *Lippia graveolens* em adição a revestimento de pectina em tomates, detectaram efeito antifúngico contra *Alternaria alternata* e aumento do teor total de fenol e da atividade antioxidante, ao mesmo tempo que houve aceitabilidade sensorial dos frutos por parte dos avaliadores.

Em pesquisa realizada por Gonçalves et. al (2015) com os óleos essenciais de *Cymbopogon citratus*, *Lippia sidoides*, e de seus constituintes majoritários, citral e carvacrol, respectivamente, sobre a atividade fungitóxica *in vitro* no controle dos fitopatógenos *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii*, foi determinado a concentração mínima inibitória para controle de 100% do crescimento micelial de ambos fitopatógenos, no entanto, quando utilizado o composto majoritário isolado de cada óleo essencial, estes foram mais efetivos, necessitando menores doses para o controle do patógeno.

Os autores Anaruma et al. (2009), estudaram 28 óleos essenciais para determinar a presença ou não de atividade antifúngica contra o patógeno *Colletotrichum gloeosporioides*, causador da antracnose e de podridões pós-colheita em diversas culturas frutíferas. Dos 28 óleos testados, 15 apresentaram potencial fungitóxico, inibindo o desenvolvimento micelial das colônias fúngicas, dando destaque para quatro óleos essenciais que valor de concentração mínima inibitória (CMI) entre 0,25 e 0,3 mg.mL⁻¹: *Coriandrum sativum*, *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon flexuosus* e *Lippia alba*. No controle pós-colheita, diretamente com frutos de

maracujá, o óleo essencial de *Cymbopogon citratus* mostrou-se eficiente no controle da doença, não havendo diferença estatística com as amostras tratadas com fungicida.

Em contra ponto, apesar de inúmeros estudos comprobatórios das atividades antimicrobianas, projetos de inovações com o uso de óleos essenciais são desenvolvidos na busca de criar novas tecnologias no combate a patógenos, em prol de tornar viável e aumentar a aplicabilidade dos mesmos. Com suas características voláteis, os óleos essenciais tornam-se instáveis e perdem suas características biofuncionais quando expostos à luz, calor, umidade, oxigênio, pH, sendo uma alternativa potencial recorrer ao encapsulamento das moléculas em substâncias como a quitosana, recorrendo à nanotecnologia, com a intenção de haver liberação gradual dos compostos e proteger as moléculas da degradação (KALAGATUR et al., 2018).

Neste contexto, os mesmos autores acima citados, em estudo desenvolvido na Índia com o óleo essencial de Palmarosa (*Cymbopogon martinii*) no controle de *Fusarium graminearum*, patógeno pós-colheita de cereais, realizaram o encapsulamento em escala nanométrica do óleo essencial em moléculas de quitosana, para redução do crescimento e produção de micotoxinas geradas pelo patógeno. Os estudos conduzidos *in vitro* e *in vivo*, em grãos de milho pelo período de 28 dias, apresentaram atividades antifúngicas e antimicotoxinas eficientes e aprimoradas em relação ao uso do óleo essencial isolado, sem encapsulamento.

2.4.2 Tratamento Térmico com Água Quente

O tratamento térmico com água quente é considerado um método físico que visa o controle de doenças nos frutos e o prolongamento do período de armazenamento (SENHOR, 2009) e consiste em realizar a submersão dos frutos ou outros produtos em recipiente ou sistema adequado com água em temperatura elevada pré-estabelecida, por determinado período de tempo. As variáveis tempo e temperatura podem ser modificadas conforme o produto tratado, podendo haver variações inclusive dentre cultivares da mesma espécie.

O objetivo principal do tratamento com água quente é de reduzir a incidência de podridões pós-colheita, causadas por inúmeros microrganismos patogênicos presentes principalmente nas áreas superficiais dos frutos.

Maxin et al. (2012), destacam que a redução de podridões pós-colheita com o uso do tratamento com água quente e de demais tratamentos térmicos em maçãs, pode ser explicado como uma combinação do efeito indireto fungistático, causado pela indução de resistência do fruto, e do efeito direto e fungicida sobre a viabilidade do agente patogênico.

Além do mais, para que se tenha um resultado bem-sucedido com o tratamento, deve-se utilizar as variáveis tempo e temperatura com cautela para que não seja provocado danos nos produtos, oriundos da má otimização do tratamento.

Kabelitz et al. (2019) destacam que o tratamento com água quente pode ser aplicado por curtos períodos de tempo (de 15 segundos até alguns minutos) e em temperaturas relativamente altas (40 a 80 °C), porém deve se ter atenção no tratamento, pois frutas com injúrias potencialmente causadas pela utilização do tratamento térmico de forma inadequada, não agradaria os fornecedores e consumidores.

De acordo com Kabelitz e Hassenberg (2018), em estudo testando a temperatura crítica em que maçãs de diferentes cultivares poderiam ser tratadas levando em consideração os aspectos físicos de conservação assim como o quesito descontaminação por microrganismos, evidenciou-se que temperaturas entre 55 e 60°C começam a provocar lesões necróticas e escurecimento da casca nos frutos independente da cultivar, enquanto na temperatura de 45°C o controle de microrganismos não foi eficiente, identificando desta forma a temperatura ótima de tratamento em 55°C e tempo de submersão dos frutos de 0,5 a 2 minutos, pois há preservação visual da maçã e redução microbiana mais eficiente.

No entanto, os mesmos autores destacam que apesar de haver um efeito direto do calor sobre os microrganismos, este não é certamente o único responsável pela eficiência do tratamento na redução das podridões. Kabelitz et al. (2019), estudaram a transferência de calor nas diferentes partes dos frutos quando submetidos a tratamento térmico, onde verificaram que mesmo em tratamento a 55°C por 30 segundos, a temperatura na superfície dos frutos não excedeu 35°C, o que seria insuficiente para inativação dos microrganismos. Kabelitz e Hassenberg (2018) destacam que alterações na camada de cera dos frutos pode ocorrer pelo derretimento provocado pelo tratamento térmico, podendo fissuras nos frutos serem recompostas e ainda estruturas fúngicas cobertas, inibindo o desenvolvimento destes (TAHIR et al., 2009).

No entanto, ainda um terceiro motivo é destacado, e por alguns autores tido como o principal efeito do tratamento térmico (MAXIN et al., 2012; KABELITZ; HASSENBERG, 2018), o qual seria a indução de resistência pela fruta, criando um sistema de autodefesa a partir da formação de proteínas de choque térmico e proteínas de patogênese relacionada, a exemplo de quitinases e β -1,3-glucanase (Schirra et al., 2000).

Em relação as variáveis qualitativas dos frutos tratados, em estudo de Lunardi et al. (2002) com maçãs cultivar Fuji inoculadas com o fungo causador da podridão branca (*Botryosphaeria dothidea*) e armazenadas em ambiente refrigerado 0 a 1°C, o tratamento

térmico reduziu os teores de acidez titulável, aumentou os teores de sólidos solúveis totais (SST) e pouco influenciou a firmeza da polpa dos frutos assim como a perda de peso.

Em estudo semelhante com maçãs armazenadas durante 15 semanas em armazenamento refrigerado a 1° C e avaliando diferentes parâmetros qualitativos dos frutos tratados com água quente a 53° C e por dois minutos, os autores Auinger et al. (2005) puderam concluir a partir de suas análises, realizadas a cada três semanas, que a firmeza da polpa dos frutos do tratamento com água quente reduziu-se com menor intensidade do que dos frutos do tratamento controle, enquanto os teores de acidez titulável declinaram mais rapidamente. Já a capacidade oxidativa, conteúdo fenólico e a avaliação sensorial não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos.

2.4.3 Tratamento com cálcio na pós-colheita

A aplicação de cálcio em frutos pode ser ministrada de diferentes formas, a exemplo via spray na pré-colheita (Sharma et al., 2013) ou ainda por meio de imersão dos frutos em solução com cálcio na pós-colheita (HUSSAIN et al., 2012).

Aplicações deste cátion geram efeitos positivos na integridade e funcionalidade da parede celular, desempenhando um papel importante na qualidade dos frutos (NATALE et al., 2005). O tratamento com cálcio na pós-colheita de maçãs é relatado por diversos autores por contribuir na manutenção da firmeza de polpa, redução de desordens fisiológicas nos frutos e diminuição de podridões (Jan et al., 2016; Klein et al., 1997; Conway et al., 1999).

A manutenção da firmeza de polpa após o tratamento com cloreto de cálcio foi observada por Hussain et al. (2012). Dukani et al. (2018), relatam que o aumento do conteúdo de cálcio nos frutos fortalece as estruturas das paredes celulares, interagindo com ácidos pécticos na parede da célula para formar pectato de cálcio, fortalecendo a parede celular e inibindo sua degradação. Neste mesmo sentido, Yamamoto et al. (2011) acrescenta que estas pontes de cálcio entre os ácidos pécticos ou entre estes e outros polissacarídeos dificultam o acesso e a ação de enzimas pectolíticas (pectinametilesterase e poligalacturonase) biossintetizadas pelo fruto e que causam amaciamento, e daquelas produzidas por microrganismos que causam deterioração.

Além de diminuir o amolecimento das frutas, Kitemann et al. (2010) observaram que o tratamento com cálcio também diminui a respiração e a produção de etileno.

Com tratamento em forma de spray com 1% de Ca na pré-colheita e tratamento térmico com água quente na pós-colheita (42 °C por 2 h), Sharma et al. (2013) relataram a manutenção

da firmeza de polpa e dos atributos de qualidade dos frutos, assim como diminuição de podridão no armazenamento.

2.4.4 Tratamento com sódio na pós-colheita

Poucos relatos são encontrados na literatura científica sobre a utilização de sódio na pós-colheita visando a conservação de frutos. Plaza et al. (2004) relatam que frutos de citrus apresentaram diminuição de podridões causadas por *Penicillium* sp. na pós-colheita após tratamento dos frutos em imersão com solução de carbonato de sódio seguido de tratamento térmico de cura. Youssef et al. (2011) também destacam o controle eficiente de *Penicillium* sp. em clementinas e laranjas com o uso de carbonato de sódio e bicarbonato de sódio.

Em análise in vitro o uso de bicarbonato de sódio inibiu o desenvolvimento micelial de *Alternaria alternata*, *Fusarium* sp. e *Rhizopus stolonifer*. Em testes seguintes in vivo, em melões de cobertos por cera contendo bicarbonato de sódio a 2%, houve redução da incidência de podridão de até sete vezes menor do que em relação ao tratamento controle (AHARONI et al., 1997).

Sais como o carbonato de sódio e bicarbonato de sódio podem ser classificados na categoria geralmente considerada como seguro (GRAS), podendo ser explicado o efeito na redução de incidência de doenças pela indução de mecanismos de defesa contra os patógenos causadores de podridões, como a síntese de fitoalexinas e das proteínas relacionadas a patogênese (PR), tais como 1,3-glucanases e quitinases, capazes de degradar os constituintes da parede celular fúngica (YOUSSEF et al., 2012; YOUSSEF et al., 2014).

2.4.5 Armazenamento em ambiente refrigerado e atmosfera controlada

Dentre as tecnologias pós-colheita utilizadas para manter a qualidade e retardar a maturação dos frutos, a refrigeração é o principal método utilizado no armazenamento de frutos (BRIZZOLARA et al., 2020). O Armazenamento refrigerado (AR) visa retirar o calor gerado pelo produto armazenado até atingir o nível de temperatura desejado, mantendo o produto sob condições controladas de temperatura e umidade relativa do ar (FERREIRA NETO et al., 2006).

Com o intuito de prolongar ainda mais o período de armazenamento dos frutos, o armazenamento em atmosfera controlada (AC) surge como uma técnica adicional ao armazenamento refrigerado, onde além do controle da umidade e da temperatura do ambiente, há ainda o controle das pressões parciais de O₂ e CO₂ dentro das câmaras (BRACKMANN et

al., 2005). O sistema combina baixas temperaturas, baixa pressão parcial de oxigênio e alta pressão parcial de gás carbônico, o que reduz a respiração do fruto e a biossíntese e ação do etileno, o que promove o aumento do tempo de conservação dos frutos devido ao fato da atividade metabólica dos frutos ser diminuída (WEBER et al., 2011).

Sendo a maçã um fruto climatérico, a utilização de atmosfera controlada contribui para o retardamento do amadurecimento da fruta (ASIF et al., 2009), reduz a ocorrência de podridões, distúrbios fisiológicos, perda de peso e murchamento, aumenta a vida de prateleira das frutas, possibilita a colheita num estado mais avançado de maturação quando as frutas apresentam melhor qualidade (GIRARDI; SANHUEZA; BENDER, 2002), no entanto as condições de temperatura e pressões parciais dos gases utilizados podem variar de cultivar para cultivar mesmo tratando-se de frutos da mesma espécie (THOMPSON, 1998).

Para maçãs 'Topaz', Neuwald e Kitemann (2016) obtiveram frutos com boa qualidade ao final de seis meses de armazenamento sob as condições de 1,0 kPa de O₂ e 2,5 kPa de CO₂ e 1°C de temperatura.

3 ARTIGO 1 - *RHIZOPUS ORYZAE* AS A CAUSE OF POST-HARVEST ROT IN 2 STRAWBERRIES AND EVALUATION OF THE USE OF ESSENTIAL OILS IN 3 *IN VITRO* AND *IN VIVO* FUNGAL CONTROL 4

5 **ABSTRACT:** Post-harvest rot caused by fungi is one of the main obstacles to extend the shelf life of strawberries.
6 Rots caused by the genus *Rhizopus sp.* are the most recurrent, However, this is the first time that a study searching
7 for control of the *Rhizopus oryzae* pathogen in strawberries has been carried out and the first report in Brazil of
8 the occurrence of the pathogen in strawberries. Thus, the objective of this work was to evaluate the fungitoxic
9 effect of the essential oils of *Aloysia citriodora*, *Aloysia hatschbachii*, *Lippia Alba*, *Cymbopogon winterianus*,
10 *Cymbopogon martinni*, *Corymbia citriodora* and *Eucalyptus grandis*, on the pathogen *Rhizopus oryzae*, *in vitro* in
11 PDA medium and on strawberries inoculated with the pathogen. The chemical composition of the essential oils
12 was carried out, majority compounds such as geraniol, α -citral, limonene, β -linallol, β -citral, eucalyptol, and β -
13 citronellal were identified. The essential oils, at concentrations of 0.0; 0.5; 1.0; 1.5; 2.0 and 2.5 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$, were
14 introduced into melting PDA medium at 50 °C and after solidification in a Petri dish, mycelial disc of the pathogen
15 was inoculated in the centre of the plate. Fungal growth evaluations were carried out during a period of 10 days.
16 The essential oils of *A. citriodora*, *C. martinni*, *L. Alba* and *E. grandis*, presented inhibitory effect on the fungal
17 development *in vitro* in the concentrations of 1.5; 2.0; 2.0 and 2.5 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$. When the essential oils were applied
18 in the *in vivo* test, the essential oils did not control the rot in the pseudo fruit.

19 **Key-words:** *Fragaria x ananassa*, alternative control, soft rot, *in vitro* control, essential compounds.
20
21

22 3.1 INTRODUCTION 23

24 The culture of strawberry (*Fragaria x ananassa*) has notable economic and social
25 importance in the producing regions, for the generation of income and employment, especially
26 in small areas in family farming, in view of the constant need for management throughout
27 production. Among the world's largest producers, China, the United States and Mexico
28 occupied the positions of the world's largest strawberry producers in 2019, with an annual
29 production of 3,041,560 t, 1,302,743 t and 681,965 t, respectively (Nation Master, 2019).

30 In crop production, one of the main challenges faced refers to the management of
31 diseases (Lorenzetti et al., 2011), either pre and post-harvest. In the post-harvest, fungal rots
32 are considered as one of the major limitations to extend the storage time of strawberries
33 (Bautista-Baños et al., 2003), which often leads to losses not only of the product but also of
34 opportunities to expand production.

35 The characteristics of the pseudo fruit explain the rapid deterioration of the product.
36 Brakmann et al. (2011) point out that strawberries are characterized by being non-climacteric
37 and highly perishable. Siqueira et al. (2009) add that strawberries have a high respiratory rate
38 and a humid substrate, rich in acids and sugars, which flavours the development of pathogens.
39 Moreover, the pseudo fruit is surrounded by a thin layer of epidermis, which makes it more
40 sensitive and susceptible to water loss, injuries and, consequently, pathogen attack, especially
41 during post-harvest.

42 Among the post-harvest rots on strawberries, *Rhizopus* sp. *rot* is considered the most
43 important (Bedendo, 2018) and, as far as control is concerned, no phytosanitary product is
44 registered in Brazil (Agrofit, 2020).

45 In the search for alternative products to control pathogens in crops and agricultural
46 products, in recent years the application of natural products such as essential oils have been
47 studied more frequently (Moghaddam et al., 2014; Xing-dong & Hua-li, 2014; Sharma et al.,
48 2017). Essential oils can be defined, according to Simões and Neto (2006), as products of
49 secondary metabolism of aromatic plants, of lipophilic and volatile character, with complex
50 chemical structure and most of the times with characteristic odour, being composed mainly by
51 terpenes and phenylpropanoids.

52 In fruit post-harvest, researchers seek the development of technological innovations in
53 the control of fungi with essential oil *in vitro* and *in vivo* (Fontana et al., 2020; Anaruma et al.,
54 2010), but the results *in vivo* do not always correspond with the same synchrony with the results
55 found in the *in vitro* phase, highlighting the need to develop more sophisticated techniques to
56 achieve the success corresponding to the previous phase, in view of the specific characteristics
57 of the products used, the pathogens under study and also the reactions that occur with the
58 interaction of these.

59 In this study the pathogen *Rhizopus oryzae* (*Rhizopus arrhizus*) was used, which showed
60 great aggressiveness in colonizing strawberry pseudo fruit. According to Uyar and Uyar (2019),
61 the pathogen is characterized as a filamentous fungus, known mainly as a lactic acid producer
62 and reported as a post-harvest pathogen. Recently, several reports carry the information of this
63 pathogen as a cause of post-harvest rots in fruits, where the first reports were made in the
64 literature as a storage pathogen of kiwi, pear, apple, watermelon and banana fruits (Feng et al.,
65 2019; Khokhar et al., 2019 (a); Khokhar et al., 2019 (b); Know et al., 2014 (a); Know et al.,
66 2012). However, only one report has been found in the literature of this pathogen as a post-
67 harvest causal agent in strawberries in Korea (Know et al., 2014 (b)). This is the first report of
68 the fungus occurring in strawberries in Brazil, and the first work to study control methods of
69 the pathogen associated with strawberries.

70 Furthermore, in view of the high susceptibility of strawberry pseudo fruits to mechanical
71 damage and *Rhizopus* pathogen attack, as well as the need for methods to control rot and
72 increase shelf life, this work aimed to evaluate the fungitoxic effect of seven essential oils on
73 the pathogen *Rhizopus oryzae*, *in vitro* and on strawberries inoculated with the pathogen.

74

75 **3.2 MATERIAL AND METHODS**

76

77 3.2.1 Place where the experiments will be carried out

78

79 This study was conducted in the laboratories and growth room of the research group of
80 the Aromatic Extractives Laboratory (LEA) of the Federal University of Santa Maria, Frederico
81 Westphalen *campus*, RS, between the months of September 2019 to January 2020.

82

83 3.2.2 Obtaining fungal isolate

84

85 The isolate of *Rhizopus oryzae* was obtained from the fungal culture collection of the
86 Laboratory of Phytopathology, Federal University of Santa Maria, Frederico Westphalen
87 *campus*, RS. Koch's postulate was successfully conducted on strawberry pseudo fruit, and after
88 preserved in Petri dish with PDA (potato dextrose agar) culture medium.

89 The isolate was identified by molecular sequencing by the Agronomy Laboratory of
90 Porto Alegre, where by ITS sequencing the isolate showed 100% identification with the fungus
91 *Rhizopus oryzae* (access number MF767597.1).

92 The fungal isolate was deposited in the LCTEA gene bank under accession number
93 01/2020.

94

95 3.2.3 Obtaining the essential oils

96

97 The essential oils used, according to botanical families, were the following:
98 Verbenaceae Family - cidróżinho (*Aloysia citriodora*), aloisia (*Aloysia hatschbachii*), lipia
99 (*Lippia alba*); Poaceae Family - citronella (*Cymbopogon winterianus*), palmarosa
100 (*Cymbopogon martinii*); Mirtaceae Family - Eucalyptus cheiroso (*Corymbia citriodora*),
101 Eucalyptus grandis (*Eucalyptus grandis*). They were obtained from the leaves of aromatic
102 plants through hydrodistillation in a graduated Clevenger apparatus or by steam dragging in
103 specialized steam equipment for extraction, carried out at the LEA of UFSM, Frederico
104 Westphalen *campus*, except for the essential oil of *Cymbopogon martinii*, which came from
105 the Laboratory of extraction of plant products of Epagri, in the Experimental Station of the city
106 of Itajaí, SC.

107 For the *Cymbopogon martinii* essential oil, the chemical characterization was
108 determined by gas chromatography coupled with a mass spectrometry detector (GC/MS), in the
109 same place where its extraction was performed. The identification of the constituents of the
110 essential oils was based on the comparison of the mass spectra with the GC/MS NIST data

111 library, and also by comparing the retention indexes calculated with those found in the literature
112 (databases - WebNIST, GMD) and in some cases by comparison with analytical standards
113 injected under the same conditions, with the results expressed in percentages.

114 For the other essential oils, the analysis of the chemical constituents of the essential oils
115 was determined by gas chromatography coupled with a mass spectrometry detector (GC-MS)
116 with a flame ionization detector (FID) in the Laboratory of Vegetable Extracts (LABEV),
117 located in the municipality of Santa Maria, on the main campus of UFSM. The constituents of
118 the essential oils were identified based on the retention index (IR) and mass spectrum
119 fragmentation models, through the Chemstation Agilent program and the uses of the NIST
120 database (LINSTROM; MALLARD, 2016), being the results expressed in percentage.

121

122 3.2.4 Determination of essential oil concentrations on fungal development and spore 123 production

124

125 The evaluation of the antifungal activities of the essential oils was carried out from the
126 observation of the inhibition of mycelial growth and spore production. To this end, an
127 experiment was conducted in a factorial scheme, in an entirely randomized design - DIC (7 x
128 6), being seven essential oils and six concentrations, [0.0; 0.5; 1.0; 1.5; 2.0 and 2.5 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$].
129 Each treatment was composed by seven repetitions, being considered each Petri dish an
130 experimental unit.

131 The essential oils were incorporated into melting PDA culture medium at 50 °C, plus
132 Twenn20 (0.05 ml) and the antibacterial Streptomycin (0.1%), and then poured into 85 mm
133 diameter Petri plates. For the control treatment (0.0 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$), only the surfactant agent
134 Twenn20 and the antibacterial Streptomycin at the same concentrations were added. After 45
135 minutes, with the medium already solidified in the petri plates, an 8 mm disc obtained from the
136 colony of the pathogen that had been growing for 10 days was placed in the centre of the plate.
137 The plates were then sealed with Parafilm[®] laboratory sealing film and stored in a growth room
138 at 25°C with a 12 hours photoperiod for 10 days.

139 In order to have a chemical treatment in parallel to analyze the toxic effect of the product
140 on fungal development, a single treatment with the fungicide of the chemical group
141 Benzimidazol - Cercobin[®] 700 WP, was used at a concentration of 70 g p.c. (commercial
142 product)/100 L of water (or PDA medium in this case). The procedures for *in vitro* inoculation
143 were the same as those used for the essential oils.

144

145 3.2.5 Assessments of fungitoxic potential *in vitro*

146

147

148 24 hours after inoculation of the pathogen according to the treatments, the first
149 evaluation was performed by measuring the diameter of the fungus colony (two orthogonal
150 measurements). This evaluation was done daily until day 10 when, the final evaluation was
151 made and the colony spores were counted. For the treatments that did not develop any mycelial
152 growth, we proceeded to a next investigation, in order to determine if the fungitoxic effect of
153 the essential oil was fungistatic, which led to the stopping of the fungal development or, if it
154 was of fungicidal effect, which resulted in the death or inviability of the mycelial growth and
155 germination of the spores.

156 For this, melted PDA medium (50°C), plus only the antibacterial Streptomycin (0.1%)
157 were poured in Petri plates. After solidification of the medium, the discs of the treatments in
158 which there was no mycelial development were transferred to such plates and conditioned again
159 in the growth room, under the same conditions. The plates were observed for a maximum period
160 of seven days. If mycelial growth occurs from the disc, the fungistatic effect is observed.
161 Otherwise, the fungicidal effect of the essential oil and the concentration of the previous
162 treatment is observed.

163 The data obtained from daily measurement of mycelial growth (MG) was used to
164 calculate the mycelial growth rate index (MGRI) according to the formula adapted by Oliveira
165 (1991), $MGRI = \sum (D - D_a) / N$, where MGRI= mycelial growth velocity index; D= current mean
166 colony diameter; D_a = mean colony diameter of the previous day; N= number of days after
167 inoculation.

168 Also, from the data obtained with the mycelial growth, the percentage of growth
169 inhibition (PGI) was calculated using the following formula, as adapted from Nascimento et al.
170 (2013): $PGI = ((\text{witness diameter} - \text{treatment diameter}) / \text{witness diameter}) \times 100$.

171 The ED50 (Effective doses - concentration of essential oil capable of inhibiting 50% of
172 the mycelial growth of the isolate) was also calculated using the regression equation and the
173 minimum inhibitory concentration (MIC) of the essential oils used in the experiment capable
174 of totally inhibiting the mycelial growth of the fungus was also determined.

175 At the end of the *in vitro* evaluations, four random plates were taken from each
176 treatment to proceed with the spore count, being performed three counts per plate, totalling 12
177 counts per treatment. Two drops of Twenn20 were added on top of each fungal colony and 20
178 ml of distilled water was added, which after removal with the aid of a flat art brush, was
179 transferred to a test tube and agitated for one minute in a vortex agitator. After agitation time to

180 homogenize the solution and separation of spores and hyphae, the solution was filtered with the
181 help of gauze tissue to separate hyphae and other impurities, and added more distilled water in
182 order to complete dilution quota of 150 ml to perform the count. The spores were counted using
183 a Neubauer camera, following the guidelines of Afenas, Zauza and Mafia (2007).

184 The analysed variables MG, MGRI, PGI and spore count were subjected to variance
185 analysis ($p < 0.05$) and, when significant, to regression analysis and Scott-knott mean test using
186 the statistical program SISVAR 5.3 (Ferreira, 2010). Due to the nature of the data, the MGRI
187 and PGI values were transformed into $\sqrt{Y+1}$ and spore count data were $\log(Y+1)$ transformed.
188 Graphs and tables were made with the aid of the Sigmaplot and Excel programs.

189

190 3.2.6 Selection of essential oils and *in vivo* test on strawberry postharvest

191

192 After *in vitro* assays, the three essential oils with the highest PGI on fungal development
193 - essential oils of Cidr zinho (*Aloysia citriodora*), Lipia (*Lippia alba*) and Palmarosa
194 (*Cymbopogon martinii*) - were selected for the *in vivo* stage.

195 Strawberries of the San Andreas cultivar produced in the experimental unit of the LEA
196 research group - UFSM/FW, under protected cultivation and without the use of chemical
197 pesticides were harvested, immediately selected and stored in a refrigerator for a period of 24
198 hours until the tests were performed.

199

200 3.2.7 Disinfestation and inoculation of pseudo fruit

201

202 The pseudo fruits were disinfected with 2% sodium hypochlorite solution for two
203 minutes, followed by rinsing with autoclaved distilled water. In a flow chamber, they were
204 placed on autoclaved paper towels until they dried.

205 The inoculation of pseudo fruits with *Rhizopus oryzae* was performed from a solution
206 with spores, calibrated with the aid of Neubauer camera at a concentration of 1×10^5
207 conidia.mL⁻¹. Aliquots of 10 μ l of the suspension were pipetted and deposited at the equatorial
208 region on needle-injured pseudo fruit and on uninjured pseudo fruit, according to the treatments.
209 There was a pause of 1 hour after inoculation to then proceed with the treatments tested.

210

211 3.2.8 Application of essential oil treatments on pseudo fruit

212

213 The experimental design was entirely randomized, by a bifactorial 2x5, with two forms
 214 of inoculation (with and without wounding) and five treatments applied: witness (only water
 215 and tween), treatment with fungicide Cercobin® 700 WP at a concentration of 70 g p.c./100 L,
 216 and three other treatments, each with the essential oils and selected doses. Each experimental
 217 unit consisted of four pseudo fruits, with three repetitions per treatment.

218 In a laminar flow chamber, the pseudo fruit, after inoculation, were treated by the spray
 219 method with a solution of sterilized distilled water containing the essential oil or the fungicide,
 220 plus dispersing agent Tween20 at 1%. The pseudo fruit were treated with the solution until the
 221 dripping point. As a control, the treatment with sterile distilled water was only increased with
 222 1% Tween20.

223 The pseudo fruit were placed on a triangular support made of soft drink straws, briefly
 224 disinfected, inside transparent rectangular plastic containers. These were placed in a growth
 225 room, under controlled temperature of 25 °C and photoperiod of 12 hours. The humidity inside
 226 the packages was controlled by keeping a cotton wool, placed in the centre of the packages,
 227 always moist.

228

229 3.2.6 Assessment of fungal infection

230

231 The pseudo fruits were incubated for 72 hours and evaluated according to the
 232 observation of fungal development at the end of this period. The evaluation was performed by
 233 observing the number of visibly infected strawberries and quantifying the severity of infection,
 234 according to a scale from 0 to 4, where: 0 = absence of symptoms; 1= < 25 % of the infected
 235 area; 2= 26 < 50 %; 3 = 51 < 75 % and 4= 76 < 100 %. The results were expressed according
 236 to the former scale using the Disease Index (DI) formula, adapted by Anaruma et al., 2010 and
 237 presented below:

$$238 \quad DI (\%) = \{[(1.n1) + (2.n2) + (3.n3) + (4.n4)].(R.4)^{-1}\}.100$$

239 Where = Disease Index (%);

240 n1 ... n4= number of fruit with respective score;

241 R= number of fruit per treatment.

242 The results obtained were submitted to variance test and when significant, the means of
 243 the treatments were compared by the Scott-Knott test (<0.05), using the statistical program
 244 Sisvar 5.3 (Ferreira, 2010).

245

246 3.3 RESULTS 247

248 3.3.1 Composition of essential oils 249

250 The composition of the essential oils used was identified and is presented in Table 1.

251 The two compounds present in the essential oil of *A. hatschbachii* in greater quantity
252 were the compounds germacrene B and β -elemen, with 12.91% and 11.05% respectively. The
253 essential oil of this plant does not present one or two majority compounds in its composition,
254 which together make up the majority of the essential oil, followed by several other minority
255 components, like most of the essential oils studied in this work.

256 It is also noteworthy that the study of this essential oil in the evaluation against
257 pathogenic fungi is unprecedented, since no report of its use in experiments of this nature has
258 so far been found in the scientific literature.

259 The other two Verbanaceae used in the study, *A. citriodora* and *L. alba*, showed α -citral
260 (geranial) (26.70%), limonene (20.26 %) and β -citral (18.89 %) as majority compounds
261 respectively; β -linalool (59.80%) and eucalyptol (10.29%).

262 From Poaceae family, the Palmarosa (*C. martinii*) essential oil showed as majority
263 compound the geraniol, responsible for 81.87% of the total composition of this oil. The
264 citronella (*C. winterianus*) essential oil presented the compounds β -citronellal (27.62%) and
265 geraniol (15.61%) as major compounds.

266 The species of the Mirtaceae family, *E. grandis* did not present a single majority
267 compound. The two compounds in highest concentrations were α -terpineol and isoborneol, with
268 20.51% and 12.65%, respectively. *C. citriodora* as well as citronella, presents as main
269 constituent the compound β -citronellal, which represents more than 48% of its constitution,
270 followed by the compound β -citronellol with almost 46%.

271

272 3.3.2 *In vitro* tests 273

274 For the variable mycelial growth velocity index (MVCI) and percentage of mycelial
275 growth inhibition (PGI), there was a significant effect between the essential oils and doses
276 studied ($p > 0.05$), and it was possible to adjust the regression equations to the levels of the
277 concentration factor for each essential oil (Figure 1 and 2, respectively).

278 In the first doses used, the lowest concentrations of the essential oils were generally not
279 very efficient in controlling fungal development. However, all the essential oils used reduced

280 the MGRI of the pathogen from the first dose, showing promising results for the first effects of
 281 the oils.

282 Tabela 1. Identification and quantification of the five major chemical components in the essential oils of *Aloysia*
 283 *citriodora* (A), *Aloysia hatschbachii* (B), *Corymbia citriodora* (C), *Cymbopogon martinii* (D), *Cymbopogon*
 284 *winterianus* (E), *Eucalyptus grandis* (F), *Lippia alba* (G) and Kovats index (IK).

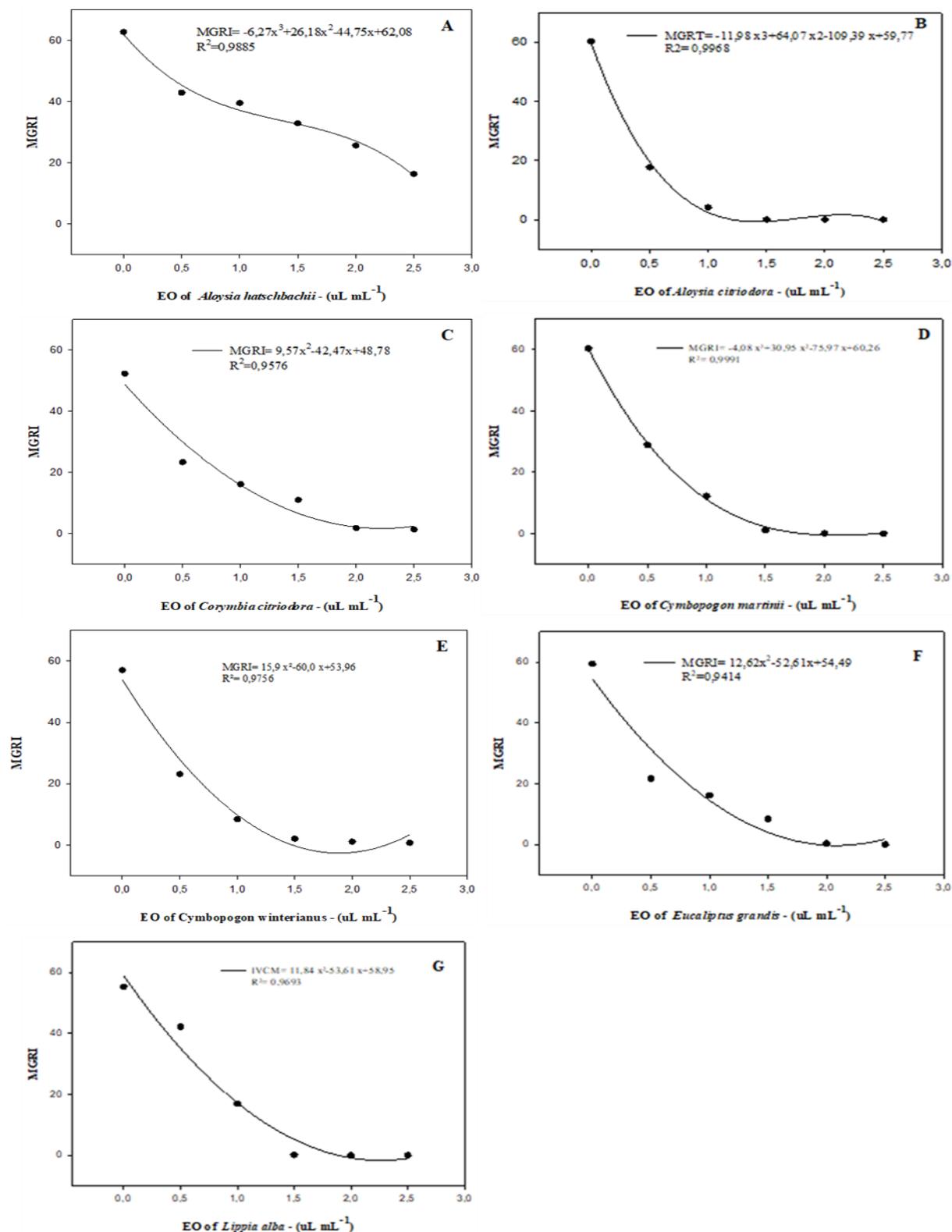
Component Name	A	B	C	D	E	F	G	IK
Methylisohexenylketon	2.36	-	-	-	-	-	-	984
β -Myrcene	-	-	-	-	-	-	-	992
Limonene	20.26	-	-	-	2.05	-	-	1028
Eucaliptol/ Cineole	-	-	-	-	-	-	10.29	1134
β -trans-Ocimene	1.07	-	-	-	-	-	-	1046
trans- β -Ocimene	-	-	-	0.42	-	-	-	1048
β -Linalool	0.63	0.68	-	1.2	-	-	59.8	1099
Fenchol	-	-	-	-	-	5.46	-	1117
α -Campholenal	-	-	-	-	-	8.02	-	1125
Cis-sabinol	-	-	-	-	-	8.69	-	1137
Isopulegol	-	-	2.27	-	-	-	-	1146
β -citronellal	-	-	48.05	-	27.62	-	-	1153
Isoborneol	-	-	-	-	-	12.65	-	1172
Terpinen-4-ol	0.73	0.38	-	-	-	-	-	1175
α -Terpineol	-	2.29	-	-	-	20.51	-	1193
cis-Geraniol	0.94	-	-	-	-	-	-	1225
β -Citronellol	-	-	45.86	-	-	-	-	1227
β -Citral	18.89	-	-	-	-	-	0.6	1238
Geraniol / (trans-G.)	1.38	-	-	81.87	15.61	-	-	1249
α -Citral (Geraniol)	26.7	-	-	0.43	-	-	0.77	1268
Citronellol acetate	-	-	1.13	-	4.41	-	-	1348
Nerol acetate	2.92	-	-	-	4.01	-	-	1372
Geranyl acetate	-	-	-	15.29	-	-	-	1379
β -Elemen	-	11.05	-	-	1.12	-	1.53	1389
Eugenol methyl ether	-	0.46	-	-	-	-	-	1399
Caryophyllene	6.02	7.46	-	-	-	-	4.78	1419
α -Humuleno	-	-	-	-	-	12.15	-	1447
α -Caryophyllene	-	1.23	-	-	-	-	-	1454
α -Curcumene	2.71	-	-	-	-	-	-	1479
Germacrene D	-	-	-	-	4.32	-	6.49	1480
β -Selinene	-	0.55	-	-	-	-	-	1486
Valencene	2.03	-	-	-	-	-	-	1494
Germacrene B	-	12.91	-	-	-	-	4.28	1495
β -Himachalene	0.72	-	-	-	-	-	-	1500
α -Selinene	-	3.79	-	-	-	-	-	1505
δ -Cadinene	-	-	-	-	4.64	-	-	1516
o-Menth-8-ene-4-methanol, α,α - dimethyl-1-vinyl-, (1S,2S,4R)-(-)-	-	-	-	-	5.81	-	-	1546
Lomgicamphenylone	-	7.71	-	-	-	-	-	1563
α -Cedrene oxide	-	7.72	-	-	-	-	-	1575
Spathulenol	2.03	1.1	-	-	-	-	-	1576
Caryophyllene oxide	4.3	1.72	-	-	-	-	-	1581
Isoaromadendrene oxide	-	1.33	-	-	-	-	-	1594
γ -Eudesmol	-	-	-	-	1.94	-	-	1630
tau-Muurolol	1.37	-	-	-	4.5	-	-	1642
Alloaromadendrene oxide	-	4.77	-	-	-	-	-	1646
tau-Cadinol	-	-	-	-	8.12	-	-	1653
Cedr-8-en-13-ol	-	2.68	-	-	-	-	-	1657
Germacra-4(15),5,10(14)-trien-1 α -ol	-	9.39	-	-	-	-	-	1680
α -Humulene<14-hidroxy	-	8.25	-	-	-	-	-	1714
Total identificado (%)	95.03	85.47	97.31	99.21	94.43	67.48	88.54	

285
 286
 287
 288

IK= Kovats Index; - = unidentified component.

289 The parallel treatment with the fungicide Cercobin® did not inhibit fungal growth at the
 290 concentration used, with the plate filling completely within two days, the same period as the
 291 control (concentration of 0.0 $\mu\text{L mL}^{-1}$ of essential oil).

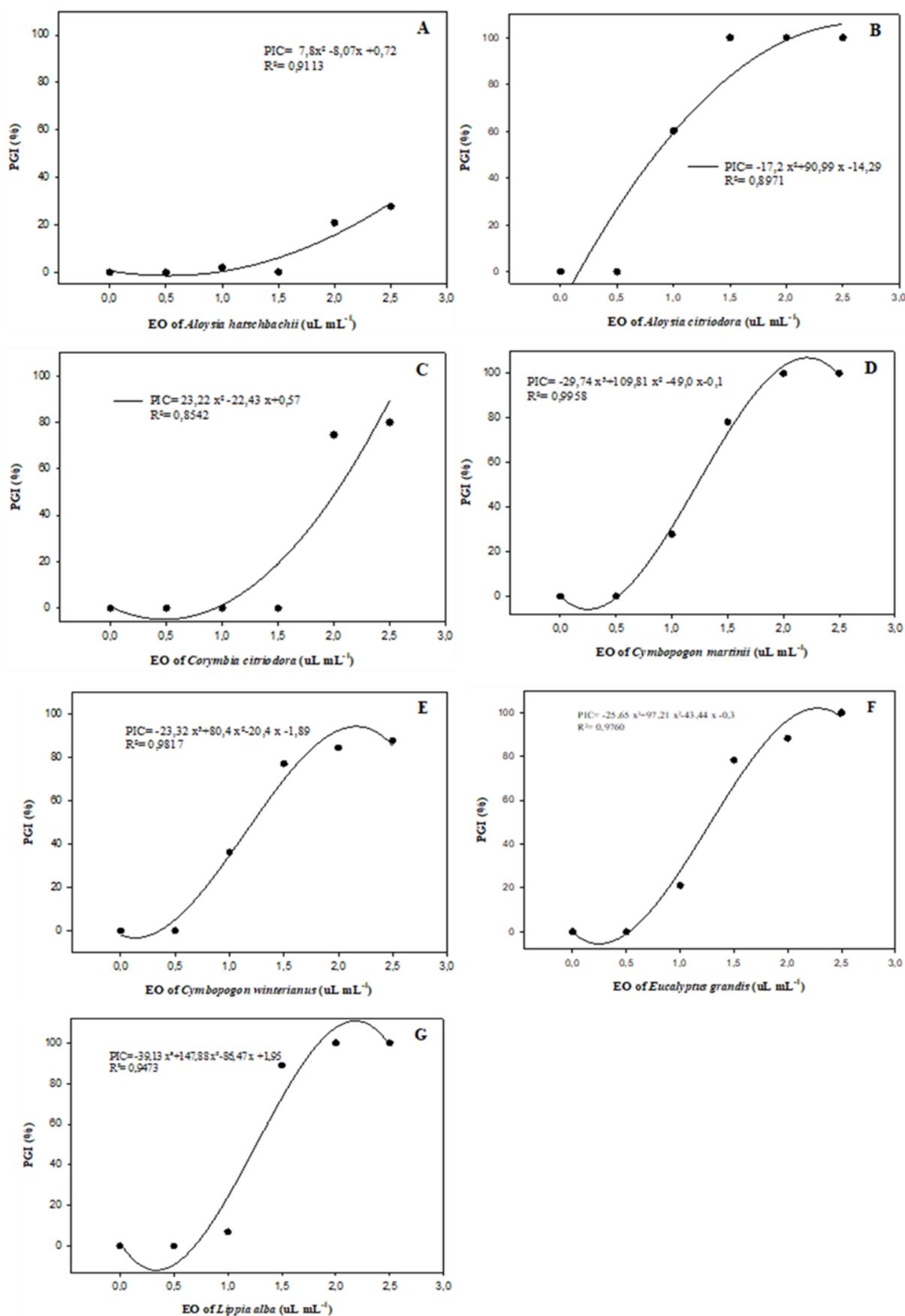
292



293

294 Figura 1. Mycelial growth rate index (MGRI) of *R. oryzae* under the action of essential oils of *Aloysia hatschbachii*
 295 (A), *Aloysia citriodora* (B), *Corymbia citriodora* (C), *Cymbopogon martinii* (D), *Cymbopogon winterianus* (E),
 296 *Eucalyptus grandis* (F) and *Lippia alba* (G) in different concentrations. (Regression analysis at $p < 0.05$).

297



298

299 Figura 2. Percentage of mycelial growth inhibition of *R. oryzae* under action of essential oils of *Aloysia*
 300 *hatschbachii* (A), *Aloysia citriodora* (B), *Corymbia citriodora* (C), *Cymbopogon martinii* (D), *Cymbopogon*

301 *winterianus* (E), *Eucalyptus grandis* (F) and *Lippia alba* (G) in different concentrations. (Regression analysis at
302 $p < 0.05$).

303

304 For the essential oil of *A. hatschbachii* (Figure 1A), reduction of the MGRI was
305 identified as the concentration of essential oil increased, however, in none of the concentrations
306 studied was there a total paralysis of its development, only a delay in mycelial development
307 was identified.

308 For the essential oils of *C. citriodora* and *C. winterianus*, at the highest dose used
309 ($2.5 \mu\text{l.mL}^{-1}$) the MGRI was close to null, as a very slow development was identified in the last
310 days of evaluation.

311 The essential oils of *A. citriodora*, *C. martinii*, *L. alba* and *E. grandis* presented doses
312 in which the MGRI was null, presenting 100% of control when evaluated the percentage of
313 mycelial growth inhibition (PGI) in these doses (figure 2).

314 *A. citriodora*, *C. martinii* and *L. alba* showed null MGRI from concentrations
315 $1.5 \mu\text{l.mL}^{-1}$, $2.0 \mu\text{l.mL}^{-1}$ and $2.0 \mu\text{l.mL}^{-1}$, respectively, being the lowest concentrations that
316 presented null MGRI of all essential oils tested in this work (Figures 1B, 1D and 1G).

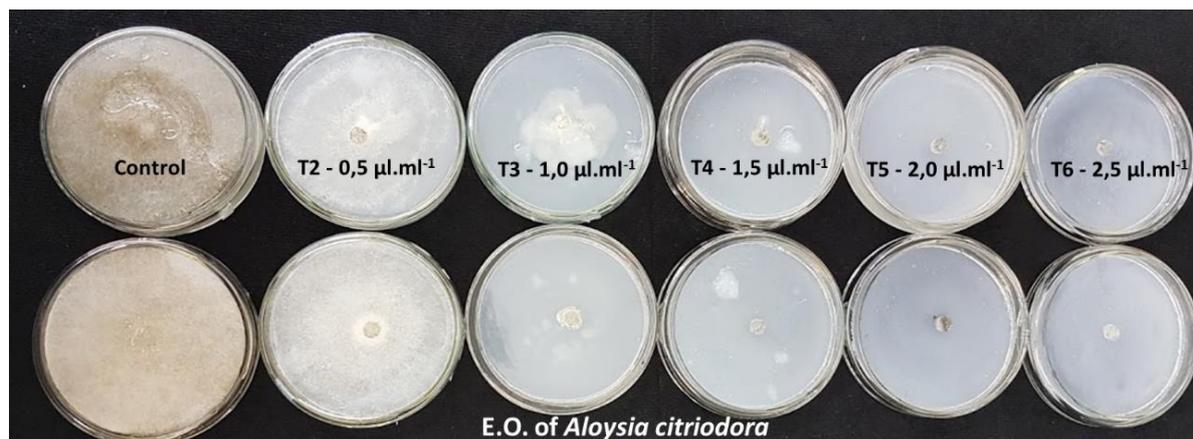
317 The percentage of mycelial growth inhibition of the pathogen under the action of each
318 oil can be seen in Figure 2. Among the essential oils studied, the essential oil of *A. hatschbachii*
319 was the one that presented the lowest percentage of mycelial inhibition. The maximum
320 inhibition obtained was with a dose of $2.5 \mu\text{l.mL}^{-1}$ (highest dose studied), which showed 27%
321 inhibition of pathogen growth.

322 The essential oil of *A. citriodora* even at the dose of $1.0 \mu\text{l.mL}^{-1}$ inhibited more than
323 60% mycelial growth, with 100% inhibition at higher doses (Figure 2B and Figure 3).

324 The 50% mycelial growth inhibitory concentration (ED50), minimum inhibitory
325 concentration (MIC) and dose with fungicidal effect, when found, was calculated for each
326 essential oil and the values are presented in Table 2.

327 The lowest inhibitory concentration (ED50) was obtained for the essential oil of *A.*
328 *citriodora* at a dose of $1.07 \mu\text{l.mL}^{-1}$, followed by the essential oils of *C. martinii* and *L. alba*,
329 with concentrations of 1.23 and $1.26 \mu\text{l.mL}^{-1}$ respectively. The same three essential oils were
330 the ones that obtained the lowest MICs, reason why they were selected to be tested in the *in*
331 *vivo* part of the study.

332



333

334 Figura 3. In vitro inhibition of *Rhizopus oryzae* mycelial growth, 10 days after incubation with different
 335 concentrations of *Aloysia citriodora* essential oil.

336

337 The fungicidal effect was found, according to the methodology used, only for the
 338 essential oils of *A. citriodora* and *C. martinii* at doses of 2.5 $\mu\text{l.mL}^{-1}$ and 2.0; 2.5 $\mu\text{l.mL}^{-1}$
 339 respectively. The other doses tested, even those that showed total inhibition of fungal
 340 development in the previous evaluations, when removed from the plate with PDA medium +
 341 essential oil to a new plate with PDA medium only, mycelial growth occurred, demonstrating
 342 that there were still viable spores in the mycelial disk placed initially, and what must have
 343 occurred would be a fungistatic effect.

344

345 Tabela 2 Regression equations, ED₅₀ values in $\mu\text{l.mL}^{-1}$ (effective doses for inhibition of 50% of mycelial growth),
 346 minimum inhibitory concentration in $\mu\text{l.mL}^{-1}$ (MIC), fungicide effect and respective doses, when found.

Essential Oil	Regression Equation	ED ₅₀	MIC	Fungicide E.
<i>A. citriodora</i>	Y= 47.99x+0.04	1.07	1.5	2.5 $\mu\text{l.mL}^{-1}$
<i>A. hatschbachii</i>	Y= 11.42x-5.78	>2.5	>2.5	N.F.
<i>C. citriodora</i>	Y= 35.63x-18.78	1.72	>2.5	N.F.
<i>C. martini</i>	Y= 48.59x-9.74	1.23	2.0	2.0; 2.5 $\mu\text{l.mL}^{-1}$
<i>C. winterianus</i>	Y= 41.82x-4.75	1.3	>2.5	N.F.
<i>E. grandis</i>	Y= 46.96x-10.77	1.29	2.5	N.F.
<i>L. alba</i>	Y= 50.4x-13.67	1.26	2.0	N.F.

347

348 N.F.= Not found in the researched doses.

349

350 Spore counts were also evaluated for all treatments and dosages (Table 3), and it can be
 351 seen that although some treatments did not inhibit mycelial development, there was a drastic
 352 reduction or even inhibition in spore production, as is the case with the reduction in spore

353 production for *A. hatschbachii* essential oil, which was radically reduced at a concentration of
 354 1.0 $\mu\text{l.mL}^{-1}$.

355 The essential oil of *A. citriodora* stood out from the others from the first dose used, with
 356 a reduction in the concentration of spores from $96,9.10^3.\text{mm}^{-1}$ to only $3,7.10^3.\text{mm}^{-1}$,
 357 demonstrating the aggressiveness of its fungitoxic effect.

358

359 Tabela 3 . Concentration of spores ($10^3.\text{mL}^{-1}$) as a function of the doses of the different essential oils studied and
 360 respective regression equation, submitted to variance analysis at 5% probability.

	Spore Concentration $\times 10^3 .\text{mL}^{-1}$						R ²
	Oil Doses ($\mu\text{l.mL}^{-1}$)						
	0.0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	
<i>A. citriodora</i>	96.92	3.72	0	0	0	0	0.9628
<i>A. hatschbachii</i>	102.12	83.77	17.79	12.42	16.78	2.17	0.9110
<i>C. citriodora</i>	111.88	45.75	40.82	32.31	0	0	0.9377
<i>C. martini</i>	173.38	89.39	22.6	0	0	0	0.9961
<i>C. winterianus</i>	50.4	30.84	38.03	0	0	0	0.7893
<i>E. grandis</i>	141.53	58.99	58.26	0	0	0	0.9386
<i>L. alba</i>	133.51	61.81	0	0	0	0	0.9857

361

362

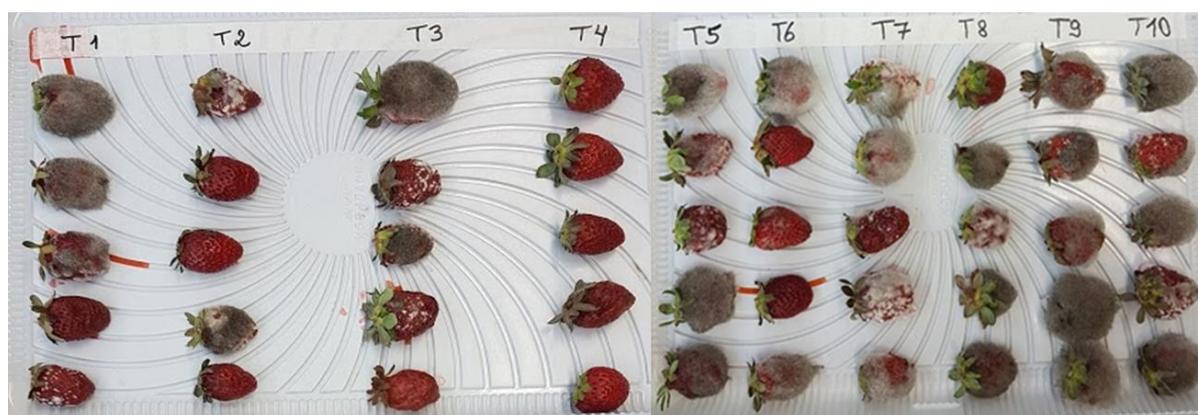
363 3.3.3 *In vivo* tests

364

365 The development of *R. orizae* rot on strawberries was not totally inhibited by any
 366 of the treatments tested (Figure 4), either by the use of essential oils of *A. citriodora*, *C. martinii*
 367 and *L. alba* or by the use of the fungicide Cercobin®.

368 However, the treatment with *A. citriodora* on inoculated strawberries without wounding
 369 (T6), the most effective decrease in the disease index as can be seen in Figure 5, even though
 370 there was no significant difference from the control treatment without wounding (T2) and the
 371 treatment with the fungicide Cercobiⁿ® without wounding (T4). The oils of *L. alba* and *C.*
 372 *martinii* (T7, T8, T9 and T10) showed no antifungal action when tested *in vivo* and stimulated
 373 the development of rot in strawberries, as well as the treatment with *A. citriodora* on
 374 strawberries that presented injury (T5).

375
376



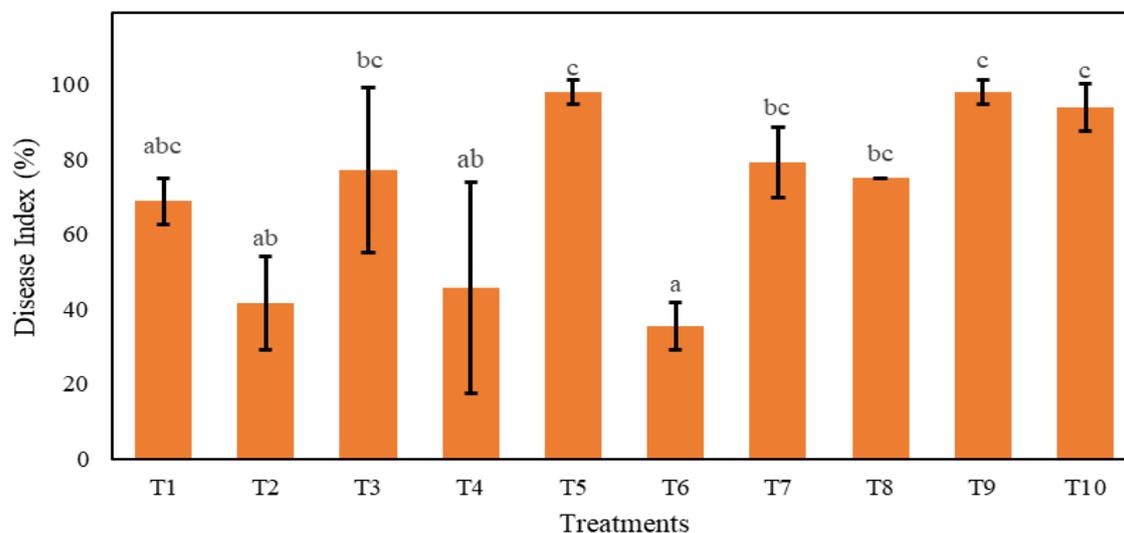
377

378 Figura 4. Result of the application of essential oil treatments on strawberries after three days of inoculation with
379 the pathogen *R. oryzae*.

380 Abbreviations: T1= witness (water) + wound; T2= witness (water) without wound; T3= Cercobin®
381 (Thiophanatemethyl 700 mg L⁻¹) + wound; T4= Cercobin®without wound; T5= EO. of *Aloysia citriodora*
382 (1.5µl.mL⁻¹) + wound; T6= EO of *A. citriodora*(1.5µl.mL⁻¹) without wound; T7= EO. of *Lippia alba* (2.0µl.mL⁻¹)
383 + wound; T8= OE. of *L. alba* (2.0µl.mL⁻¹); T9= EO. of *Cymbopogon martini* (2.0µl.mL⁻¹) + wound; T10= EO.
384 of *C. martini* (2.0µl.mL⁻¹) without wound).

385

386



387

388 Figura 5. Disease index (%) of *R. oryzae* on strawberries after third day of inoculation with the pathogen, inoculated
389 1 h before treatments.

390 Abbreviations: T1= witness (water) + wound; T2= witness (water) without wound; T3= Cercobin®
391 (Thiophanatemethyl 700 mg L⁻¹) + wound; T4= Cercobin®without wound; T5= EO. of *Aloysia citriodora*
392 (1.5µl.mL⁻¹) + wound; T6= EO of *A. citriodora*(1.5µl.mL⁻¹) without wound; T7= EO. of *Lippia alba* (2.0µl.mL⁻¹)
393 + wound; T8= OE. of *L. alba* (2.0µl.mL⁻¹); T9= EO. of *Cymbopogon martini* (2.0µl.mL⁻¹) + wound; T10= EO.
394 of *C. martini* (2.0µl.mL⁻¹) without wound).

395 Equal letters do not differ statistically by Tukey test($p \leq 0.05$).

396

397 3.4 DISCUSSION

398

399 Essential oils are composed of several compounds and their mechanism of action on the
400 pathogen, can occur at several sites, either due to the results of a synergism of their compounds
401 or due to the presence of their majority compounds (Oliveira et al., 2015).

402 When studied by Lorenzetti et al. (2011) the effect of essential oils in the fungal control
403 of *Botrytis cinerae*, the authors highlight that because the species *C. citratus* and *C. martinii*
404 are from the Poaceae family, they present in their composition similar monoterpenoids and
405 majority compounds, citral and geraniol, which would be the possible responsible for antifungal
406 actions. Geraniol and compounds of structure close to citral, as α -citral and β -citral also
407 identified in essential oils of these studies (*A. citriodora*, *C. martinii* and *C. winterianus*).

408 The researchers Xi Tang et al. (2018) also in a study with the compounds geraniol and
409 citral seeking to elucidate the mechanisms of action against cereal storage pathogens
410 (*Aspergillus sp.*), detected through different analyses that the compounds alter the permeability
411 of the fungal cell membrane, induce the intracellular accumulation of ROS (reactive oxygen
412 species) and also interfere in the inhibition of the biosynthesis of several genes, such as growth
413 regulatory genes, the sporulation gene *brlA* - gene activator of asexual sporulation transcription
414 and also biosynthetic genes of the toxin aflatoxin.

415 Although the precise mechanisms of action of essential oils are not yet fully elucidated,
416 one of the main existing mechanisms has direct or indirect interaction with the main steroid
417 present in fungi, ergosterol (Zacchino, 2001), an important component of the plasma membrane
418 of fungi and a good indicator of fungal growth (Galvão et al., 2003), given that its presence is
419 of fundamental importance for normal growth and functioning of the fungal cell membrane
420 (Lira Mota et al., 2012).

421 According to Zhou et al. (2018) in research with the purified metabolic components of
422 essential oils, carcravol and eugenol, in the control of *Rhizopus stolonifer* in post-harvest rot of
423 peach fruits, these components caused a decrease in ergosterol content in the fungi, leading to
424 the rupture of fungal cell membranes and consequent cytoplasmic leakage of the cells, which
425 explains the inhibition of fungal development, both *in vitro* and *in vivo*.

426 When performed the application of the essential oil of *Thymus vulgaris* and its phenolic
427 compound - thymol in a study with *Rhizopus oryzae*, the investigation of the mechanism of
428 antifungal action showed that these have an interaction with ergosterol, which entails the
429 disruption of the fungal membrane and loss of intracellular content (Lira Mota et al., 2012).

430 According to Kalembe and Kunicka (2003), the classification of the antimicrobial
431 activity of essential oils can be classified as follows: phenols> aldehydes> ketones> alcohols>

432 ethers> hydrocarbons, the lipophilic character of their hydrocarbon skeleton and the hydrophilic
433 character of their functional groups being of fundamental importance.

434 In evaluation of the antifungal effect of essential oils on different pathogens, Brum et
435 al. (2014) evaluating *in vitro* the action of essential oils of *Cymbopogon nardus* and *Lippia alba*
436 on the pathogen *Pyricularia grisea*, causing brusone in rice, found inhibitory concentrations at
437 0.75 and 1.0 $\mu\text{l.mL}^{-1}$, respectively. These concentrations are in agreement with the inhibitory
438 concentrations verified in this work, as well as the concentrations studied by Mohammadi et al.
439 (2013) in work with the pathogen *Rhizopus stolonifer*, where they determined that fennel
440 (*Foeniculum vulgare*) essential oil, which has anethole as the majority compound (75%),
441 perfectly inhibited the *in vitro* growth of the fungus at concentration higher than 0.6 $\mu\text{l.mL}^{-1}$.

442 As verified in this study, the pathogen *Rhizopus oryzae* demonstrated great
443 aggressiveness in development. In a study with pathogen of the same genus, *Rhizopus*
444 *stolonifer*, Oliveira et al. (2019) confirm the aggressiveness of the pathogen when evaluated *in*
445 *vitro* and *in vivo*, which presents high growth rates, reaching 100% growth in petry disc also in
446 only 48 hours.

447 Using 26 essential oils to evaluate the antifungal potential of volatile compounds *in vitro*
448 of *Rhizopus stoloniefer* at a single dose of 0.15 $\mu\text{l.mL}^{-1}$, Yan et al. (2020) selected the four best
449 oils: *Mentha piperita*, *Mentha sPGIata*, *Thymus vulgaris* CT *carvacol*, *Thymus vulgaris* CT
450 *thymol*, which showed inhibition of 92 to 98% in mycelial growth. *Cymbopogon martinii* was
451 also used, but the maximum inhibition observed was 42% in the same incubation period.

452 Despite the extremely positive results found in the *in vitro* evaluation with the different
453 oils, the same synchrony was not observed in the *in vivo* phase. Benato et al. (2018), reports
454 that not always the *in vivo results* with the use of essential oil correspond with the results
455 obtained in the *in vitro* phase, which itself was confirmed in part of their study with *Penicillium*
456 *digitatum* associated in orange fruits, in which the use of lemongrass and palmarosa essential
457 oils increased the severity of green mold compared to the control treatment, when evaluating
458 the curative effect on the fruits inoculated with the pathogen.

459 Furthermore, it is worth noting that the temperature and humidity conditions in which
460 the strawberries were submitted were ideal for fungal development and that the characteristics
461 of the product facilitate rapid colonisation and degradation by the pathogen. Furthermore, high
462 initial inoculum concentration was applied and it was a highly aggressive pathogen.

463 As previously highlighted, no study was found in the Brazilian literature reporting the
464 association of the pathogen *R. oryzae* with strawberries, and at the global level, only one report

465 of occurrence of the fungus associated with strawberries was found in Korea (Know et al. 2014).
466 No study was found, aiming the control of the pathogen in strawberries.

467 Other authors have carried out studies with essential oils applied to strawberry,
468 associated with the pathogen of the same genus, *R. stolonifer*. Yan et al. (2020) after selecting
469 the best essential oils based on *in vitro* results, used the essential oils of *Mentha piperita*,
470 *Mentha spicata*, *Thymus vulgaris* CT *carvacol*, *Thymus vulgaris* CT *thymol* in *in vivo* tests
471 with strawberries and peaches inoculated with *R. stolonifer*. All four essential oils, incorporated
472 into paper filters within commercial packaging, reduced the severity and incidence of rot in
473 strawberry and peach fruit, however they did not inhibit rot in fruit.

474 With the strawberry treatment in controlling the fungal development of *Colletotrichum*
475 *sp.* in artificially inoculated strawberries, Fontana et al. (2020) observed promising results also
476 with the essential oil of *A. citriodora*, which stood out from the other oils studied.

477 In an *in vivo* evaluation with strawberries inoculated with *R. stolonifer*, when wrapped
478 by emulsion with *Lippia sidoides* essential oil with carboxymethylcellulose (CMC), Oliveira et
479 al. (2019) found a reduction in rot severity compared to fruit without application of the
480 treatment, especially when treated curatively.

481 482 **3.5 CONCLUSION** 483

484 The essential oils of *A. citriodora*, *C. martinni*, *L. alba* and *E. grandis*, showed
485 inhibitory effect on fungal development *in vitro* at concentrations of 1.5, 2.0, 2.0 and 2.5
486 $\mu\text{l.mL}^{-1}$. On the other hand, when evaluated the fungicidal effect, only the essential oils of *C.*
487 *martinni* and *A. citriodora* from the doses of 2.0 and 2.5 $\mu\text{l.mL}^{-1}$ respectively, showed such
488 effect according to the methodology and doses used.

489 On strawberries experiment treatment with essential oil no controlled the rot caused by
490 the pathogen *R. oryzae*.

491 The essential oils are potential tools for the development of alternative products in
492 antimicrobial combat, however, more studies are necessary to unveil mechanisms and develop
493 technologies that provide the application and efficiency of essential oils also *in vivo*, on
494 strawberry pseudo fruits.

495
496
497

498 **BIBLIOGRAPHIC REFERENCES**

- 499
- 500
- 501 Anaruma, N. D. et al. (2010). Control of *Colletotrichum gloeosporioides* (penz.) Sacc. In
- 502 yellow passion fruit using *Cymbopogon citratus* essential oil. *Brazilian Journal of*
- 503 *Microbiology*, 41(1), 66-73.
- 504
- 505
- 506 AGROFIT - Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários - Sistema de informação sobre
- 507 Agrotóxicos. Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento. Brasília, DF. Disponível
- 508 em: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em 13 nov
- 509 2020.
- 510
- 511 Alfenas, A. C.; Zauza, E. A. V.; Mafia, R. G. (2007) Produção, Determinação e Calibração da
- 512 Concentração de Inóculo em Suspensão. In: ALFENAS, A. C.; Mafia, R. G. (Ed.). Métodos
- 513 em fitopatologia. Vicçosa: UFV, 2007. p. 103-116.
- 514
- 515 Anaruma, N.D.; Schmidt, F.L.; Duarte, M.C.T.; Figueira, G.M.; Delarmelina, C.; Benato, E.A.;
- 516 Sartoratto, A. (2010) Control of *Colletotrichum gloeosporioides* (penz.) Sacc. in yellow
- 517 passionfruit using *Cymbopogon citratus* essentialoil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.41,
- 518 p.66-73.
- 519
- 520 Antunes, L. E. C.; Bonow, S.; Reisser Junior, C. (2020) Morango, crescimento constante em
- 521 área de produção. Anuário Hortifrutí 2020, Campo e Negócios, p.88-92.
- 522
- 523 Bautista–Baños, S.; García–Dominguez, E.; Barrera–Necha, L.L.; Reyes–Chilpa, R.; Wilson
- 524 C.L. (2003) Seasonal evaluation of postharvest fungicidal activity of powders and extracts of
- 525 huamuchil (*Pithecellobium dulce*): action against *Botrytis cinerea*, *Penicillium*
- 526 *digitatum* and *Rhizopus stolonifer* of strawberry fruit. *Postharvest Biology and Technology*,
- 527 Amsterdam, v.29, p.81–93.
- 528
- 529 Brackmann, Auri, Pavanello, Elizandra Pivotto, Both, Vanderlei, Janisch, Djeimi Isabel,
- 530 Schmitt, Odair José, & Giménez, Gustavo. (2011). Avaliação de genótipos de morangueiro
- 531 quanto à qualidade e potencial de armazenamento. *Revista Ceres*, 58(5), 542-
- 532 547. doi.org/10.1590/S0034-737X2011000500002
- 533
- 534 Bedendo, I. P. (2018) Podridões de órgãos de reserva. In: Amorim, L.; Rezende, J. A. M.;
- 535 Bergamin Filho, A. Manual de Fitopatologia, Vol. I, Princípios e Conceitos, 5ª Ed. Ouro Fino
- 536 – MG: Agronômica Ceres. p. 317 – 321.
- 537
- 538 Benato, Eliane Aparecida, Belletti, Thatyane Cristina, Terao, Daniel, & Franco, Daniel Andrade
- 539 de Siqueira. (2018). Óleos essenciais e tratamento térmico no controle pós-colheita de bolor
- 540 verde em laranja. *Summa Phytopathologica*, 44(1), 65-71. doi.org/10.1590/0100-5405/175659
- 541
- 542 Brum, R. B. C. S.; de Castro, H. G.; Cardon, C. H.; Pereira, A. S.; Cardoso, D. P.; Rodrigues
- 543 dos Santos, G. (2014) Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre fungos fitopatogênicos.
- 544 *Magistra online, Cruz das Almas – BA, V. 26, n.3, p. 361 – 371*
- 545
- 546

- 547 Fontana, D. C.; Neto, D.D., Pretto, M. M. et al., (2020) Using essential oils to control diseases
548 in strawberries and peaches, *International Journal of Food Microbiology*
549 doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108980
550
- 551 Feng, L., Qu, Z., Cheng, J.S., Xie, J.T., Fu, Y.P., and Guo, D.Y. (2019). First report of
552 postharvest rot caused by *Rhizopus oryzae* of kiwifruit in Shandong Province, China. *Pl. Dis.*
553 103(11): 2951.
554
- 555 Galvao, J. G. et al. (2003) Uso do fungo *Fusarium oxysporum* como indicador de ametrina,
556 através da medida de biomassa, pela quantificação do ergosterol. *Ciênc. agrotec.* [online].
557 vol.27, n.4
558
- 559 Kalembe D, Kunicka A. (2003) Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr*
560 *Med Chem.*10:813–29.
561
- 562 Khokhar, I., Jia, Y., Mukhtar, I., Wang, J.H., Ruth, N., Eltoukhy, A., Fan, S.H., Li, X.J., Wang,
563 J.Y., and Yan, Y.C. (2019). First report of *Rhizopus oryzae* causing postharvest fruit rot on pear
564 in China. *Pl. Dis.* 103(6): 1423. (a)
565
- 566 Khokhar, I., Mukhtar, I., Wang, J., Jia, Y., Yan, Y. (2019). A report of *Rhizopus oryzae* causing
567 postharvest soft rot of apple fruit in China. *Australasian Plant Disease Notes* 14: 7. (b)
568
- 569 Kwon, J.-H., Ha, J.-S., and Kim, J. (2014). Postharvest soft rot on *Citrullus vulgaris* caused
570 by *Rhizopus oryzae* in South Korea. *Australasian Plant Disease Notes* 9: 129. (a)
571
- 572 Kwon, J. H.; Kang, D. W.; Yoon, H. S.; Kwak, Y. S.; Kim, J. H. (2014). *Rhizopus* Fruit Rot
573 Caused by *Rhizopus oryzae* on Strawberry. *Journal of Agriculture & Life Science.* 48. 27-34.
574 10.14397/jals.2014.48.4.27. (b)
575
- 576 Kwon, J.-H., Ryu, J.-S., Chi, T.T.P., Shen, S.-S., and Choi, O. 2012. Soft rot of *Rhizopus*
577 *oryzae* as a postharvest pathogen of banana fruit in Korea. *Mycobiology* 40(3): 214-216.
578
- 579 Lira Mota, K .; de Oliveira Pereira, F .; de Oliveira, W .; Lima, I .; de Oliveira Lima, E.
580 Antifungal Activity of *Thymus vulgaris* L. Óleo essencial e seus fitoquímicos constituintes
581 contra *Rhizopus oryzae*: Interação com Ergosterol. *Moléculas* 2012,17, 14418–14433
582
- 583 Lorenzetti, E.R.; Monteiro, F.P.; Souza, P.E.; Souza, R.J.; Scalice, H.K.; Diogo JR, R.; Pires,
584 M.S.O. (2011) Bioatividade de óleos essenciais no controle de *Botrytis cinerea* isolado de
585 morangueiro. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai, Botucatu*, v.13, especial, p.619-627.
586
- 587 Moghaddam M, Alymanesh MR, Mehdizadeh L, Mirzaei H, Pirbalouti AG. (2014) Chemical
588 composition and antibacterial activity of essential oil of *Ocimum ciliatum*, as a new source of
589 methyl chavicol, against ten phytopathogens. *Ind Crops Prod.* 2014; 59:144–8
590
- 591
- 592 Mohammadi P, Lotfi N, Naseri L, Etebarian HR (2013) Antifungal activities of essential oils
593 from some Iranian medicinal plants against various post harvest moulds. *J Med Plants Res*
594 7(23):1699–1708.
595
- 596 Nation Master. Top Countries in Strawberries Production - Source FAO. 2019. Disponible in:
597 Top countries for Strawberries Production - Source FAO (nationmaster.com)

- 598
599 Nascimento, J. M.; Serra, A. P.; Bacchi, L. M.; Gavassoni, W. L.; Vieira, M. C. (2013)
600 Inibição do crescimento micelial de *Cercospora calendulae* Sacc. por extratos de plantas
601 medicinais. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, v.15, n.4, p.751-756.
602
- 603 Oliveira, J. A. (1991) Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento
604 de plântulas de pepino (*Cucumis sativas* L.) e pimentão (*Capsicum annanum* L.). 111 f.
605 Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras,
606 1999.
607
- 608 Oliveira, Jacqueline & parisi, marise & Baggio, Juliana & Silva, Paula & Paviani, Bruna &
609 Spoto, Marta & da Gloria, Eduardo. (2019). Control of Rhizopus stolonifer in strawberries by
610 the combination of essential oil with carboxymethylcellulose. International Journal of Food
611 Microbiology. 292.
612
- 613 Oliveira, Wylly Araújo de, Arrua, Juliana Moura Mendes, Wanderley, Paulo Alves, Lima, Rita
614 Baltazar de, & Lima, Edeltrudes de Oliveira. (2015). Effects of the essential oil of Cymbopogon
615 winterianus against Candida albicans. Revista Pan-Amazônica de Saúde, 6(3), 21-26.
616
- 617 Sharma, V. I. S. H. N. U.; Sharma, A. N. I. M. A.; Seth, R. U. C. H. I., (2017). Evaluation
618 of antifungal activity of *Citrus grandis* essential oil and chemical composition. Int. J.
619 Pharm BioSci, 8, 149-155.
620
- 621 Simões, C.M.O.; Spitzer, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.;
622 GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (2006) Farmacognosia:
623 da planta ao medicamento. 6.ed. Porto Alegre: UFRGS, 2006, p. 467-496.
624
- 625 Siqueira, Heloísa Helena de et al . (2009) Armazenamento de morango sob atmosfera
626 modificada e refrigeração. Ciênc. agrotec., Lavras , v. 33, n. spe, p. 1712-1715.
627
- 628 Uyar, Gülsüm Ebru ÖZER, & UYAR, Başar. (2019). Effects of ethanol and ultraviolet-c
629 treatments on inactivation of Rhizopus oryzae spores which cause postharvest rot. Food Science
630 and Technology , 39 (3), 691-695. Epub 14 de novembro de
631 2018. dx.doi.org/10.1590/fst.04618 <https://doi.org/10.1590/fst.04618>
632
- 633 Xing-dong L, Hua-li X (2014) Antifungal activity of the essential oil of Zanthoxylum
634 bungeanum and its major constituent on Fusarium sulphureum and dry rot of potato tubers.
635 Phytoparasitica 42(4):509–517
636
- 637 Xi Tang, Shao Y.-L., Tang Y.-J., Zhou W.-W. Antifungal Activity of Essential Oil Compounds
638 (Geraniol and Citral) and Inhibitory Mechanisms on Grain Pathogens (*Aspergillus*
639 *flavus* and *Aspergillus ochraceus*) Molecules. 2018;23:2108. doi:
640 10.3390/molecules23092108.
641
- 642 Yan, J., Wu, H., Shi, F., Wang, H., Chen, K., Feng, J., & Jia, W. (2020). Antifungal activity
643 screening for mint and thyme essential oils against *Rhizopus stolonifer* and their application in
644 postharvest preservation of strawberry and peach fruits. Journal of Applied
645 Microbiology. doi:10.1111/jam.14932
646

- 647 Zacchino, S. Estratégia para a descoberta de novos agentes antifúngicos. (2001) In: YUNES,
648 R.A. E CALIXTO, J.B. Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna.
649 Chapecó: Argos. p. 435-479.
650
- 651 Zhou D. et al. (2018) Carvacrol and eugenol effectively inhibit *Rhizopus stolonifer* and control
652 postharvest soft rot decay in peaches. J Appl Microbiol.124(1):166-178. doi:10.1111/jam.13612

4. Artigo 2 - Óleos essenciais podem contribuir no controle de podridão Bolor Azul em maçãs?

Can essential oils contribute to the control of Blue Mould Rot in apples?

Resumo: O trabalho teve como objetivo de avaliar a atividade antifúngica de cinco óleos essenciais no controle de podridão pós-colheita em frutos de maçãs. Cinco óleos essenciais foram testados *in vitro* e *in vivo* contra o patógeno *Penicillium expansum*, causador da podridão Bolor Azul em maçãs. Os constituintes químicos dos óleos essenciais foram identificados. Os resultados *in vitro* demonstraram que os óleos essenciais e seus diferentes componentes possuem evidente efeito fungitóxico contra o patógeno. Os óleos essenciais de *A. Citriodora*, *C. citratus*, *C. martinii* apresentaram CMI (concentração mínima inibitória) = 0,8 $\mu\text{l.mL}^{-1}$, enquanto *C. winterianus* e *A. hadtsibachii* apresentaram CMI = 1,0 e $> 1,0 \mu\text{l.mL}^{-1}$. No entanto, os óleos essenciais de *C. martinii* e *C. citratus* apresentaram efeito fungicida. Os três óleos essenciais com menor CMI foram aplicados, via aspersão, no teste *in vivo* em maçãs da cultivar “Fuji”, inoculadas artificialmente com conídios do patógeno *P. expansum*. Tratamento controle e tratamento com aplicação do fungicida Cercobin[®] foram também avaliados pelo período de seis dias em temperatura ambiente e a AACPD e eficácia do controle em comparação ao tratamento controle foram calculadas. Os tratamentos *in vivo* com o óleo essencial de *C. martinii* apresentaram a menor AACPD, diferindo-se estatisticamente do tratamento controle e não diferindo-se do tratamento com fungicida, apresentando taxa de eficiência de controle aproximadamente em 30%.

Palavras-chaves: *Penicillium expansum*; podridões pós-colheita; compostos aromáticos; efeito fúngico; *Malus domestica* Borkh, podridão de armazenamento.

Abstract: Five essential oils were tested *in vitro* and *in vivo* against the pathogen *Penicillium expansum*, the cause of Blue Mould Rot in apples. The chemical constituents of the essential oils were identified. The *in vitro* results demonstrated that the essential oils and their different constituents have evident fungitoxic effect against the pathogen. The essential oils of *A. citriodora*, *C. citratus*, *C. martinii* showed MIC (minimum inhibitory concentration) = 0.8 $\mu\text{l.mL}^{-1}$, while *C. winterianus* and *A. hadtsibachii* showed MIC=1.0 and $>1.0 \mu\text{l.mL}^{-1}$. However, the essential oils of *C. martinii* and *C. citratus* showed fungicidal effect. The three essential oils with lower

35 MIC were applied, via sprinkling, in the *in vivo* test on apples of the cultivar "Fuji",
36 artificially inoculated with conidia of the pathogen *P. expansum*. Control treatment and
37 treatment with application of the fungicide Cercobin® were also evaluated for a period
38 of six days at room temperature and the AACPD and efficacy of the control compared
39 to the control treatment were calculated. The *in vivo* treatments with *C. martinii*
40 essential oil showed the lowest AACPD, differing statistically from the control treatment
41 and not differing from the fungicide treatment, showing control efficiency rate of
42 approximately 30%.

43 **Keywords:** *Penicillium expansum*; postharvest rots; aromatic compounds; fungal
44 effect; *Malus domestica* Borkh, storage rot.

45

46 **4.1 .Introdução**

47

48 A maçã é um dos frutos mais apreciados e conhecidos por todo o mundo.
49 Dados da safra de 2019 mostram que o Brasil ocupa a 11^a Posição no ranking mundial
50 de produção do fruto, com uma produção de mais de 1,2 milhões de toneladas, o que
51 lhe garante ser o segundo maior produtor de maçã na América do Sul, atrás somente
52 do Chile (FAO, 2020).

53 Os desafios na cadeia de produção não se limitam somente a campo.
54 Podridões pós-colheitas estão entre os principais problemas que acarretam redução
55 do tempo de prateleira em frutos de maçãs, onde o patógeno *Penicillium expansum*
56 Link, causador da podridão bolor azul nos frutos, destaca-se como um dos agentes
57 patológicos de maior importância causador de podridões em maçãs armazenadas
58 (Tas; Karaca, 2015; Frisvad; Samson, 2004). Em estudo de Kabelitz e Hassenberg
59 (2018), os autores verificaram que dos frutos de maçãs acometidos por podridões,
60 75% dos mofos identificados eram causados pelo fungo *Penicillium* sp., seguido por
61 *Cladosporium* sp. (14%) e *Aspergillus* sp. (7%). Além de provocar perdas significativas
62 durante o armazenamento e período de comercialização dos frutos, o patógeno tem a
63 capacidade de alterar as características organolépticas do fruto devido a produção da
64 micotoxina patulina (Mendes et al., 2016), a qual é tóxica a humanos e pode acarretar
65 em comprometimentos à saúde (Falleiros de Pádua; Machinski Junior, 2005).

66 O controle de *Penicillium expansum* em maçãs fica limitado ao uso de
67 diferentes produtos à base de cloro ou fungicidas registrados à base de iprodione ou
68 do grupo dos benzimidazóis (Rocha Neto; Di Piero, 2013). Populações do patógeno

69 resistentes a benzimidazóis já foram relatadas (Baraldi et al., 2003), sendo portanto
70 de interesse da cadeia produtiva, a busca por métodos alternativos ou adicionais que
71 possam vir a agregar no controle de podridões pós-colheita, aumentando desta forma
72 as possibilidades de controle no meio da produção integrada.

73 Distintas tecnologias são buscadas com frequência por inúmeros
74 pesquisadores para suprir tal demanda. Trabalhos com o uso de revestimentos
75 comestíveis (Sapelli et al., 2020; Fontes et al., 2008), aplicação de quitosina (Schao
76 et al., 2015) e substâncias naturais como extratos vegetais e óleos essenciais em
77 frutas (Neri et al., 2006; Rienth et al., 2019; Vieira et al., 2018) são algumas das
78 alternativas pesquisadas que visam controlar ou amenizar o ataque de patógenos.

79 Destes, destacam-se os óleos essenciais que são substâncias aromáticas
80 extraídas de plantas e reconhecidas como seguros para a saúde humana e o ambiente
81 (Yan et al., 2020). Tas e Karaca (2015) relataram que o óleo essencial de orégano
82 apresentou resultados promissores *in vitro* e em frutos de maçã contra *P. expansum*.
83 Já Neri et al. (2006), utilizaram nove óleos essenciais de plantas aromáticas para
84 testar suas atividades *in vitro* para o mesmo patógeno, porém com testes *in vivo*
85 realizados em frutos de pera.

86 Conhecer a atividade antifúngica dos óleos essenciais para o controle de
87 doenças pode ser alternativa promissora para maximizar a eficiência de controle de
88 podridões. Assim, este trabalho teve por objetivo determinar a eficácia do uso dos
89 óleos essenciais de *Aloysia citriodora*, *Aloysia hadtsibachii*, *Cymbopogon citratus*,
90 *Cymbopogon martinii* e *Cymbopogon winterianus* no controle do patógeno *P.*
91 *expansum* em meio *in vitro* e em teste com frutos de maçãs da cultivar “Fuji”.

92

93 **4.2 Material e métodos**

94

95 4.2.1 Local de realização dos experimentos e obtenção do isolado e óleos 96 essenciais

97

98 Este estudo foi conduzido no Laboratório de Extrativos Aromáticos (LEA) e em
99 sala de crescimento da Universidade Federal de Santa Maria, *campus* Frederico
100 Westphalen, RS, entre os meses de dezembro de 2019 a junho de 2020.

101

102 4.2.2 Obtenção do isolado 103

104 O patógeno *Penicillium expansum* foi isolado a partir de fruto de maçã
105 colonizado com o agente patogênico, no Laboratório de Fitopatologia da Universidade
106 Federal de Santa Maria, campus Frederico Westphalen, RS. O isolado foi conservado
107 em placa de Petri com meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar).

108 O isolado foi identificado por sequenciamento molecular pelo Laboratório
109 Agrônômica de Porto Alegre, onde por meio de sequenciamento *benA*, mostrou 100%
110 compatível com a identificação do fungo *Penicillium expansum* (acesso número
111 MK862430.1).

112 O isolado fúngico foi depositado no banco genético do LEA, sob o número de
113 acesso 02.2020.

114 115 4.2.3 Extração do óleo essencial e composição química 116

117 Os óleos essenciais utilizados, de acordo com as famílias botânicas, foram os
118 seguintes: Família Verbenaceae - cidrãozinho (*Aloysia citriodora*) e aloisia (*Aloysia*
119 *hatschbachii*); Família Poaceae – capim-limão (*Cymbopogon citratus*); citronela
120 (*Cymbopogon winterianus*) e palmarosa (*Cymbopogon martinii*). Os mesmos foram
121 obtidos a partir de folhas das plantas aromáticas, cultivadas a campo e extraídos por
122 meio de hidrodestilação em aparelho graduado Clevenger ou por arraste a vapor em
123 equipamento a vapor especializado para extração, realizadas no LEA da UFSM,
124 campus Frederico Westphalen, com exceção do óleo essencial de palma-rosa,
125 proveniente do Laboratório de Óleos Essenciais (LABOE) da estação experimental da
126 Epagri de Itajaí, SC.

127 Para o óleo essencial de palma-rosa, a caracterização química foi determinada
128 por cromatografia gasosa acoplado com detector de espectrometria de massa
129 (CG/EM), no mesmo local onde foi realizado a extração deste. A identificação dos
130 constituintes dos óleos essenciais foi baseada na comparação dos espectros de
131 massas com biblioteca de dados NIST do CG/EM, e também pela comparação dos
132 índices de retenção calculados com os encontrados na literatura (bases de dados –
133 WebNIST, GMD) e em alguns casos através de comparação com padrões analíticos
134 injetados nas mesmas condições, sendo os resultados expressos em porcentagem.

135 Para os demais óleos essenciais, a análise dos constituintes químicos dos óleos
136 essenciais foi determinada por cromatografia gasosa acoplado com detector de

137 espectrometria de massa (CG-EM) com detector de ionização em chama (DIC) no
138 Laboratório de Extrativos Vegetais (LABEV), localizado no município de Santa Maria,
139 no campus sede da UFSM. Os constituintes dos óleos essenciais foram identificados
140 com base no índice de retenção (IR) e dos modelos de fragmentação de espectro de
141 massas, através do programa Chemstation Agilent e as utilizações da base de dados
142 NIST (LINSTROM; MALLARD, 2016), sendo os resultados expressos em
143 porcentagem.

144

145

146 4.2.4 Testes *in vitro*

147

148

149 4.2.4.1 Determinação das concentrações de óleos essenciais sobre o 150 desenvolvimento fúngico e produção de esporos

151

152

153 A avaliação das atividades antifúngicas dos óleos essenciais foi realizada a
154 partir da observação da inibição do crescimento micelial e na produção de esporos.
155 Para tal, um experimento foi conduzido em esquema fatorial, em delineamento
156 inteiramente casualizado - DIC (5 x 6). Os cinco óleos essenciais avaliados foram
157 *Aloysia citriodora*, *Aloysia hatschbachii*, *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon*
158 *winterianus* e *Cymbopogon martinii*; já as seis concentrações testadas foram 0,0; 0,2;
159 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 $\mu\text{l.mL}^{-1}$. Cada tratamento foi composto por sete repetições, sendo
160 considerado cada placa de Petri uma unidade experimental.

161 Em câmara de fluxo laminar os óleos essenciais foram incorporados em meio
162 de cultura BDA fundente a 50°C, acrescido de Twenn₂₀ (0,05 ml) e do antibacteriano
163 Streptomicina (0,1%), e após vertidos em fundos de placas de Petri de 90 mm de
164 diâmetro. Para o tratamento controle (0,0 $\mu\text{l.mL}^{-1}$), somente foi adicionado o agente
165 surfactante Twenn₂₀ e o antibacteriano Streptomicina nas mesmas concentrações.
166 Após 45 minutos, com o meio já solidificado nas placas de petri, procedeu-se com a
167 disposição no centro da placa, de um disco de 8 mm obtido a partir da colônia do
168 patógeno em crescimento há 10 dias. Em seguida, as placas foram seladas com filme
169 de vedação de laboratório marca Parafilm® e acondicionadas em sala de crescimento
170 a 25 °C, com fotoperíodo de 12 horas, pelo período de 10 dias.

171 Devidos as características altamente esporulantes do fungo e a necessidade
172 de crescimento de apenas uma colônia para possibilitar as avaliações, o crescimento
173 da colônia fúngica teve de ser realizado em tampa de placa de petri, acondicionada

174 contra outra tampa e deixado de modo invertido durante todo o período de crescimento
175 e avaliação.

176 Para efeito de comparação com um tratamento químico, instalou-se um único
177 tratamento com o fungicida do grupo químico Benzimidazol - Cercobin[®] 700 WP, na
178 concentração de 70 g do p.c. (produto comercial)/ 100 L de água (ou meio BDA neste
179 caso). Os procedimentos para inoculação *in vitro* foram os mesmos realizados com os
180 óleos essenciais.

181

182 4.2.4.2 Avaliações do potencial fungitóxico *in vitro*

183

184 Após 48 horas da inoculação do patógeno conforme os tratamentos, a primeira
185 avaliação foi realizada medindo-se o diâmetro da colônia do fungo (duas medidas
186 ortogonais). Esta avaliação procedeu-se a cada dois dias até o 10^o dia, quando houve
187 a avaliação final e a contagem de esporos das colônias. Para os tratamentos que não
188 desenvolveram nenhum crescimento micelial, procedeu-se para uma próxima
189 investigação, a fim de determinar se o efeito fungitóxico do óleo essencial era
190 fungistático, que levava a uma paralisação do desenvolvimento fúngico, ou se era de
191 efeito fungicida, que acarretava na morte ou inviabilidade do crescimento micelial e
192 germinação dos esporos.

193 Para tal, meio BDA fundente (50 °C), acrescidas somente do antibacteriano
194 Streptomina (0,1%) foram vertidos em placas de Petri. Após solidificação do meio,
195 os discos dos tratamentos em que não houve desenvolvimento micelial foram
196 transferidos para tais placas e acondicionadas novamente na sala de crescimento,
197 sob as mesmas condições. As placas foram observadas no período máximo de sete
198 dias. Havendo o desenvolvimento micelial a partir do disco, constata-se o efeito
199 fungistático. Caso contrário, constata-se o efeito fungicida do óleo essencial e da
200 concentração do tratamento anterior.

201 Os dados obtidos a partir da medição diária do crescimento micelial (CM) foram
202 utilizados para calcular o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM),
203 conforme a fórmula adaptada por Oliveira (1991), $IVCM = \frac{\sum (D - D_a)}{N}$, onde IVCM=
204 índice de velocidade de crescimento micelial; D= diâmetro médio atual da colônia; D_a=
205 diâmetro médio da colônia do dia anterior; N= número de dias após a inoculação.

206 Ainda, a partir dos dados obtidos com o crescimento micelial foi calculado a
207 percentagem de inibição de crescimento (PIC), por meio da fórmula a seguir, conforme

208 adaptação de Nascimento et al.(2013): $PIC = ((\text{diâmetro da testemunha} - \text{diâmetro do}$
209 $\text{tratamento}) / \text{diâmetro da testemunha}) \times 100$.

210 Calculou-se ainda o ED₅₀ (concentração de óleo essencial capaz de inibir 50%
211 do crescimento micelial do isolado) a partir da utilização da equação de regressão e
212 determinado também a concentração mínima inibitória (CMI) dos óleos essenciais
213 utilizados no experimento capaz de inibir totalmente o crescimento micelial do fungo.

214 No final das avaliações *in vitro*, quatro placas aleatórias foram retiradas de cada
215 tratamento para proceder com a contagem de esporos, sendo realizado três
216 contagens por cada placa, totalizando 12 contagens por tratamento. Para tal, teve-se
217 o auxílio de uma câmara de Neubauer ou Hemacitômetro, seguindo orientações de
218 Afenas et al., (2007).

219 Foram adicionadas em cima de cada colônia fúngica duas gotas de Twenn₂₀ e
220 20 ml de água destilada, a qual após remoção com o auxílio de pincel artístico chato,
221 foi transferida para tubo de ensaio e agitado por 1 minuto em agitador vortex. Após
222 tempo de agitação para homogeneização da solução e separação dos esporos e hifas,
223 a solução foi filtrada com o auxílio de tecido gaze para separar hifas e demais
224 impurezas, e acrescido de mais água destilada, a fim de completar quota de diluição
225 de 150 ml para realização da contagem.

226

227 4.2.4.3 Análise estatística

228 As variáveis analisadas CM, IVCM, PIC e contagem de esporos foram
229 submetidas à análise de variância ($p < 0,05$) e, quando significativos, à análise de
230 regressão e a teste de média Scott-knott através do programa estatístico SISVAR 5.3
231 (Ferreira, 2010). Devido a natureza dos dados, os valores de IVCM e PIC foram
232 transformados em $\sqrt{Y + 1}$ e os dados de contagem de esporos transformados em Log
233 (Y+1). Gráficos e tabelas foram realizadas com o auxílio do programa Excel.

234

235 4.2.5 Teste *in vivo* na pós-colheita de maçãs

236

237 Após ensaios *in vitro*, os três óleos essenciais com menor CMI no
238 desenvolvimento fúngico - óleos essenciais de Cidrãozinho (*Aloysia citriodora*), Capim-
239 limão (*Cymbopogon citratus*) e Palmarosa (*Cymbopogon martinii*) - foram
240 selecionados para a etapa *in vivo*.

241 Maçãs da cultivar Fuji, adquiridas no comércio local, oriundas da região de
242 Vacaria-RS foram utilizadas para realização dos experimentos. Frutos de tamanho e
243 aparência homogêneas foram selecionados, com frutos de peso médio de 150 g.

244

245 4.2.5.1 Desinfestação e inoculação do patógeno nos frutos

246

247 Os frutos foram desinfetados com solução de hipoclorito de sódio a 1,5%, por
248 um período de 3 minutos, seguidos de enxague com água destilada autoclavada. Em
249 câmara de fluxo, estes foram dispostos em papel toalha autoclavado até que
250 ocorresse a secagem dos mesmos.

251 A inoculação dos frutos com *Penicillium expansum* foi realizada a partir de
252 solução com esporos, calibrada com auxílio de câmara de Neubauer na concentração
253 de 1×10^5 conídios.mL⁻¹.

254 Com o auxílio de uma ponteira de metal de 2 mm de diâmetro e com sinalização
255 de 4 mm de profundidade, ferimentos foram realizados na região equatorial dos frutos,
256 um em cada lado do fruto, seguido com adição de alíquotas de 10 µl de suspensão
257 com solução de esporos sob os ferimentos, os quais permaneceram cerca de uma
258 hora inoculados antes de realizar os tratamentos com os óleos essenciais.

259

260 4.2.5.2 Aplicação dos tratamentos nos frutos

261

262 O tratamento aplicado diretamente nos frutos foi através do método de
263 aspersão, com auxílio de um borrifador. O delineamento experimental foi o
264 inteiramente casualizado – DIC, constituídos por oito tratamentos aplicados: T1-
265 testemunha (somente água e tween); T2- tratamento com fungicida Cercobin® 700 WP
266 na concentração de 70 g do p.c. (produto comercial).100 L⁻¹; T3- OE. de *A. citriodora*
267 0,8 µl.mL⁻¹; T4- OE. de *A. citriodora* 4,0 µl.mL⁻¹; T5- OE. de *C. citratus* 0,8 µl.mL⁻¹; T6-
268 OE. de *C. citratus* 4,0 µl.mL⁻¹; T7- OE. de *C. martinii* 0,8 µl.mL⁻¹; T6- OE. de *C. martinii*
269 4,0 µl.mL⁻¹.

270 Cada unidade experimental foi constituída de cinco frutos, havendo três
271 repetições por tratamento.

272 Em câmara de fluxo laminar, os frutos, após inoculação, foram tratados pelo
273 método de aspersão com solução de água destilada esterilizada contendo o óleo
274 essencial ou o fungicida, através de um borrifador de volume de 250 mL, acrescido de

275 duas gotas do agente dispersante Tween₂₀. Os frutos foram tratados com a solução
276 até o ponto de escorrimento. Como controle, o tratamento com água destilada
277 esterilizada foi somente acrescido com o agente dispersante Tween₂₀.

278 Os frutos foram acondicionados sob suporte cilíndrico elaborado a partir de
279 cano PVC, brevemente desinfetados e dispostos dentro de embalagens plásticas
280 transparentes de formato retangular, de dimensões de 42 x 32 x 12 cm. Estas foram
281 dispostas em sala de crescimento, sob temperatura controlada de 25°C e fotoperíodo
282 de 12 horas, mantendo-se sempre algodão úmido no interior das embalagens
283 plásticas.

284

285 4.2.5.3 Avaliação da infecção fúngica e de atributos de qualidade dos frutos

286

287 As avaliações foram realizadas diariamente após o segundo dia da aplicação
288 dos tratamentos, durante cinco dias, a partir da medição da lesão nos frutos causada
289 pelo patógeno, com o auxílio de paquímetro digital. A partir destas avaliações, foi
290 calculada a área abaixo da curva de progresso de doença (AACPD) através da fórmula
291 proposta por Shaner e Finney (1977).

292 Após a finalização das medições das lesões nos frutos, procedeu-se com as
293 medições de acidez titulável (AT) e dos sólidos solúveis totais (SST) dos frutos. A AT
294 foi determinada em uma amostra de 5 mL de suco dos frutos, obtidos a partir de fatias
295 transversais dos frutos e trituradas em uma centrífuga elétrica. Esta amostra foi diluída
296 em 45 mL de água destilada e titulada, com titulador manual, com uma solução de
297 hidróxido de sódio 0,1 N e duas gotas de fenolftaleína a 2%, até o ponto de viragem
298 com pH 8,1; sendo os resultados expressos em % de ácido málico. O conteúdo de
299 SST foi determinado por meio de um refratômetro manual, utilizando o suco da maçã
300 extraído conforme citado para a AT, e os resultados expressos em °Brix.

301 Os resultados obtidos foram submetidos a teste de variância e quando
302 significativos, as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott-Knott
303 (<0,05), por meio do programa estatístico Sisvar 5.3 (Ferreira, 2010).

304

305 **4.3 Resultados e discussão**

306

307 A composição dos óleos essenciais utilizados no estudo é apresentada na
308 Tabela 1.

309 Tabela 1. Identificação e quantificação dos componentes químicos nos óleos
 310 essenciais de *Aloysia citriodora* (A), *Aloysia hatschbachii* (B), *Cymbopogon citratus*
 311 (C), *Cymbopogon martinii* (D), *Cymbopogon winterianus* (E) e índice de Kovats (IK).

Componente	A	B	C	D	E	IK
Methylisohexenylketon	2,36	-	-	-	-	984
β -Myrcene	-	-	8,33	-	-	992
Limonene	20,26	-	-	-	2,05	1028
β -trans-Ocimene	1,07	-	-	-	-	1046
trans- β -Ocimene	-	-	-	0,42	-	1048
β -Linalool	0,63	0,68	-	1,2	-	1099
<i>β-citronellal</i>	-	-	-	-	27,62	1153
Terpinen-4-ol	0,73	0,38	-	-	-	1175
α -Terpineol	-	2,29	-	-	-	1193
cis-Geraniol	0,94	-	-	-	-	1225
β -Citral	18,89	-	32,78	-	-	1238
Geraniol / (trans-G.)	1,38	-	-	81,87	15,61	1249
α -Citral (Geranial)	26,70	-	56,52	0,43	-	1268
Citronellol acetate	-	-	-	-	4,41	1348
Nerol acetate	2,92	-	-	-	4,01	1372
Geranyl acetate	-	-	-	15,29	-	1379
β -Elemen	-	11,05	-	-	1,12	1389
Eugenol methyl ether	-	0,46	-	-	-	1399
Caryophyllene	6,02	7,46	-	-	-	1419
α -Caryophyllene	-	1,23	-	-	-	1454
α -Curcumene	2,71	-	-	-	-	1479
Germacrene D	-	-	-	-	4,32	1480
β -Selinene	-	0,55	-	-	-	1486
Valencene	2,03	-	-	-	-	1494
Germacrene B	-	12,91	-	-	-	1495
β -Himachalene	0,72	-	-	-	-	1500
α -Selinene	-	3,79	-	-	-	1505
δ -Cadinene	-	-	-	-	4,64	1516
α -Menth-8-ene-4-methanol, α,α -dimethyl ⁻¹ -vinyl-, (1S,2S,4R)-(-)-	-	-	-	-	5,81	1546
Longicamphenylone	-	7,71	-	-	-	1563
α -Cedrene oxide	-	7,72	-	-	-	1575
Spathulenol	2,03	1,10	-	-	-	1576
Caryophyllene oxide	4,3	1,72	-	-	-	1581
Isoaromadendrene oxide	-	1,33	-	-	-	1594
γ -Eudesmol	-	-	-	-	1,94	1630
tau.-Muurolol	1,37	-	-	-	4,50	1642
Alloaromadendrene oxide	-	4,77	-	-	-	1646
tau.-Cadinol	-	-	-	-	8,12	1653
Cedr-8-en ⁻¹³ -ol	-	2,68	-	-	-	1657
Germacra-4(15),5,10(14)-trien ⁻¹ α -ol	-	9,39	-	-	-	1680
6-Isopropenyl-4,8a-dimethyl ⁻¹ ,2,3,5,6,7,8,8a-octahydro-naphthalen-2-ol	-	4,80	-	-	-	1714
α -Humulene<14-hidroxy	-	8,25	-	-	-	1714
Total identificado (%)	95,03	90,28	97,63	99,21	94,43	

312 IK = Índice de Kovats; - = componente não identificado.

313 Os dois compostos presentes em maior quantidade no óleo essencial de *A.*
314 *hatschbachii* foram o germacrene B e β -elemen, com 12,91% e 11,05%
315 respectivamente. O estudo deste óleo essencial na avaliação contra fungos
316 patogênicos é inédito, pois não foi encontrado na literatura científica relato do seu uso
317 em experimentos desta natureza.

318 *A. citriodora* apresentou respectivamente os compostos majoritários α -citral
319 (geranial) (26,70%), limonene (20,26 %) e β -citral (18,89 %). Fontana et. al (2020)
320 também identificaram β -citral and limonene como compostos majoritários no óleo
321 essencial de *A. citriodora*.

322 Os outros três óleos essenciais, todos pertencentes ao gênero *Cymbopogon*
323 apresentaram compostos como geraniol, citral ou geranial e demais compostos
324 próximos. O óleo essencial de Palmarosa (*C. martinii*) mostrou como composto
325 majoritário – geraniol, responsável por 81,87% da composição total deste óleo. O óleo
326 essencial de Capim Limão (*C. citratus*) apresentou como composto majoritário α -citral
327 ou geranial (56,52%) e o composto β -citral (32,18%). Já Citronela (*C. winterianus*),
328 apresentou os compostos β -citronellal (27,62%) e geraniol (15,61%) como
329 majoritários.

330 A constituição química do óleo essencial de *C. citratus* em estudo de Aquino et
331 al. (2014) também foi relatada por apresentar como principais constituintes β -Citral e
332 α -Citral (Geranial), com 34,05 e 43,69% respectivamente, o que corrobora com os
333 resultados no presente trabalho. Para o óleo essencial de *C. martinii*, Kalagatur et al.
334 (2018) também detectou o composto geraniol como composto majoritário, seguido do
335 composto geraniol.

336 Avaliando o controle *in vitro* dos patógenos *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium*
337 *rolfsii* com o óleo essencial de *Cymbopogon citratus* e seu composto majoritário citral,
338 Gonçalves et al. (2015), concluíram que a atividade antifúngica do óleo essencial de
339 *C. citratus* está relacionada diretamente com este componente. Enquanto o óleo
340 essencial de *C. citratus* inibiu 100% de crescimento micelial de *R. solani* na
341 concentração de 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$, o composto citral apresentou 100% de inibição com a
342 metade desta concentração. Para *S. rolfsii*, 100% de inibição ocorreu com as
343 concentrações de 300 e 225 $\mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente.

344 Já Brum et al. (2014) avaliando *in vitro* o efeito antifúngico dos óleos essenciais
345 de *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon nardus* e de *Lippia alba* sobre diferentes
346 patógenos, verificaram que em *Pyricularia grisea* causador da brusone em arroz,

347 concentrações inibitória em 0,5; 0,75 e 1,0 $\mu\text{l.mL}^{-1}$, respectivamente. Para os outros
348 patógenos, o óleo essencial de *C. citratus* foi o que mais se destacou também na
349 inibição do crescimento de *Didymella bryoniae* e *Rhizoctonia solani* a partir da
350 concentração de 0,50 $\mu\text{l.mL}^{-1}$ do óleo.

351 Em pesquisa com os componentes citral e geraniol contra duas espécies do
352 género *Aspergillus* sp., Tang et al. (2018) encontraram efeito total inibitório do
353 desenvolvimento fúngico *in vitro* com as doses de 0,5 $\mu\text{l.mL}^{-1}$ do composto citral e
354 inibição de mais de 98% na mesma dose para o composto geraniol.

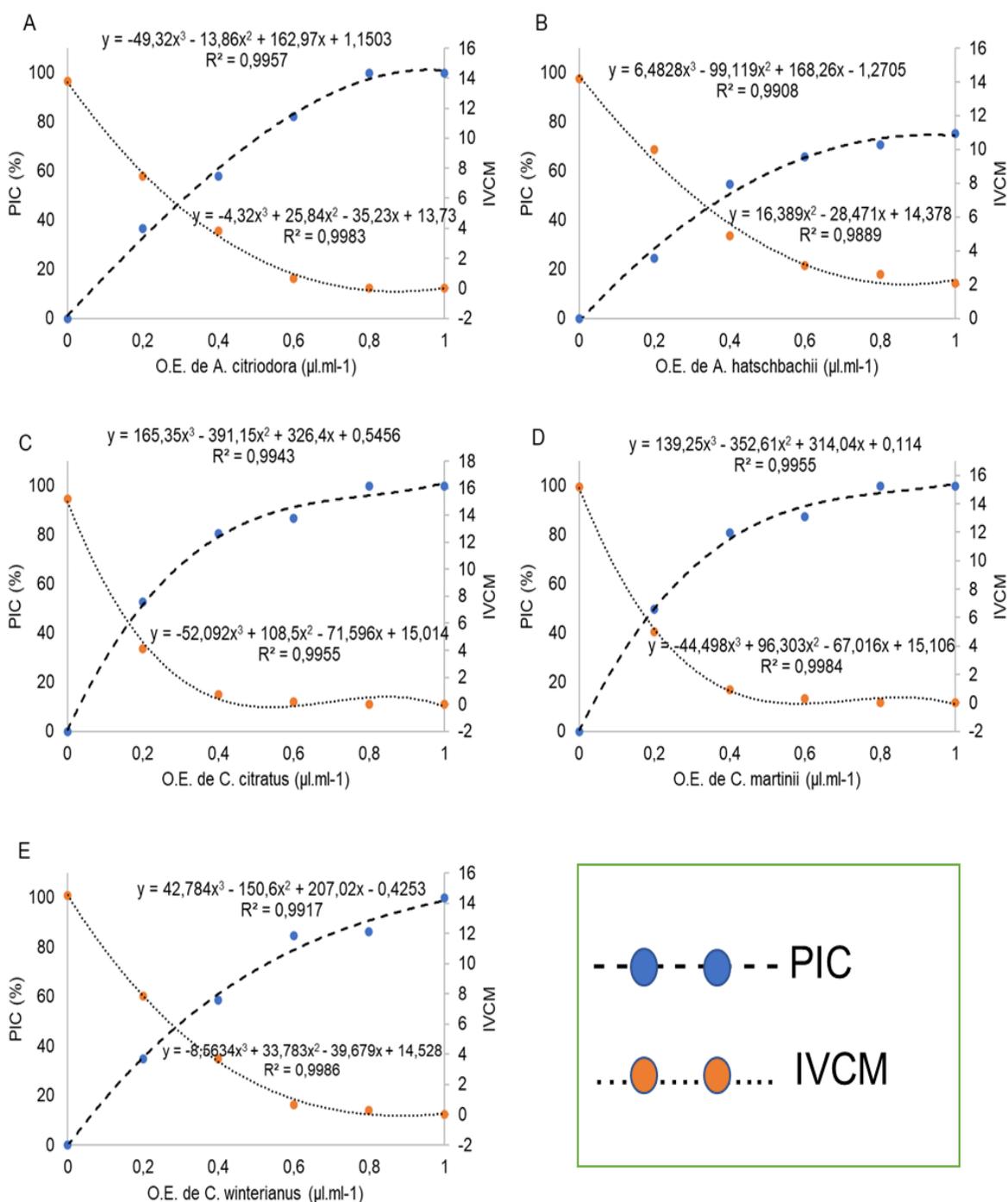
355 As variáveis índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) e
356 percentagem de inibição de crescimento micelial (PIC) foram submetidas à análise de
357 regressão, onde os fatores óleos essenciais e doses estudadas apresentaram
358 interação significativa ($p>0,05$), sendo possível ajustar as equações de regressão aos
359 níveis do fator concentração para cada óleo essencial (Figura 1).

360 Para o óleo essencial de *A. citriodora*, a variável IVCM apresentou uma redução
361 de quase 50% já na primeira dose estudada, variando de 13,77 para 7,49 na dose de
362 0,2 $\mu\text{l.mL}^{-1}$. Na dose de 0,6 $\mu\text{l.mL}^{-1}$ apresentou IVCM praticamente nulo, de 0,67,
363 porém no final da avaliação a inibição final resultante foi de 82,26%, havendo 100%
364 da inibição do crescimento a partir da dose de 0,8 $\mu\text{l.mL}^{-1}$.

365 O óleo essencial de *A. hatschbachii*, assim como os demais tratamentos,
366 apresentou redução do crescimento micelial ao passo que aumentavam as
367 concentrações do óleo essencial, no entanto, não inibiu completamente o
368 desenvolvimento micelial em nenhuma das doses estudadas. O melhor resultado,
369 observado na maior concentração administrada (1,0 $\mu\text{l.mL}^{-1}$) inibiu 75% do
370 crescimento micelial em comparação com o tratamento testemunha (0,0 $\mu\text{l.mL}^{-1}$),
371 enquanto o IVCM diminuiu de 14,19 para 2,08 da maior dose para a menor,
372 respectivamente.

373 Entre os óleos essenciais de *C. citratus* e *C. martinii* (Foto 2), os resultados
374 obtidos foram bastante semelhantes. A inibição total do crescimento micelial foi
375 observada a partir da dose de 0,8 $\mu\text{l.mL}^{-1}$ para ambos os óleos, sendo que mais de
376 80% do crescimento micelial foi inibido já com a dose de 0,4 $\mu\text{l.mL}^{-1}$, ao passo que o
377 IVCM diminuiu de cerca de 15,2 da testemunha, para 0,74 e 0,9 para *C. citratus* e *C.*
378 *martinii*, respectivamente, o que demonstra o efeito agressivo de ambos os óleos
379 essenciais no controle do patógeno.

380 O terceiro óleo essencial pertencente ao gênero *Cymbopogon* sp., *C.*
 381 *winterianus*, também apresentou resultados interessantes, porém a eficiência no
 382 controle do patógeno demonstrou ser ligeiramente menor quando comparado aos
 383 outros dois óleos do gênero. A inibição do crescimento micelial de 100% foi obtida
 384 com a concentração de 1,0 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ e o IVCM a partir da dose de 0,6 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ ficou
 385 próximo a 0,7; com PIC maior que 80% de controle.

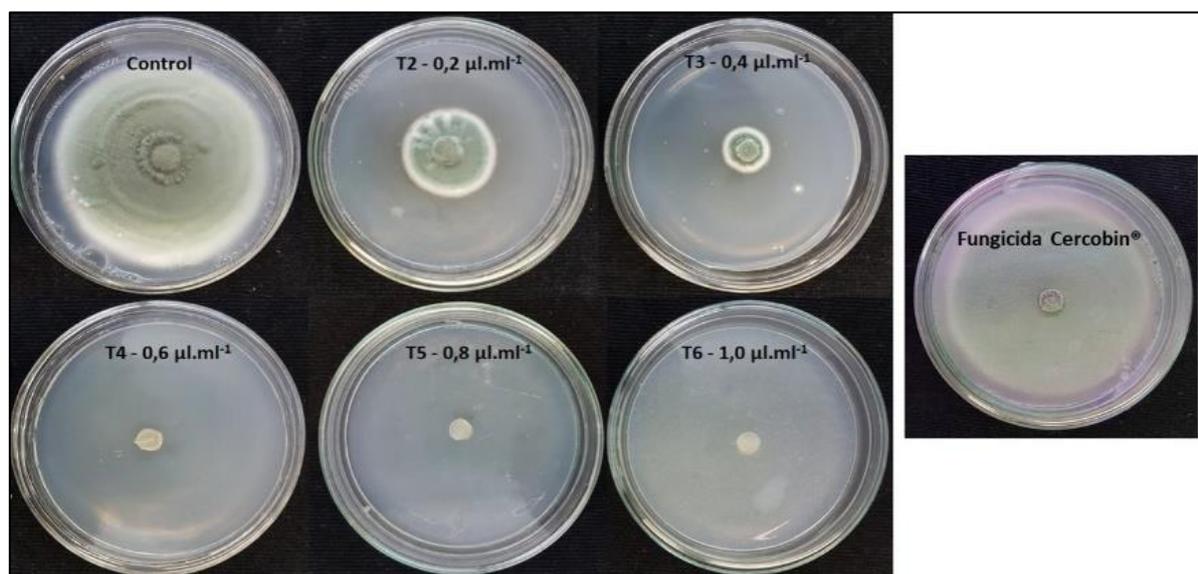


386

387 Figura 1. Porcentagem de Inibição do Crescimento Micelial - PIC (%), Índice de
 388 Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM), nas seis concentrações dos óleos

389 essenciais de *Aloysia citriodora* (A), *Aloysia hatschbachii* (B), *Cymbopogon citratus*
 390 (C), *Cymbopogon martinii* (D) e *Cymbopogon winterianus* (E), submetidas à análise
 391 de regressão ($p > 0,05$).

392



393

394 Figura 2. Inibição in vitro do crescimento micelial de *Penicillium expansum*, 10 dias
 395 após incubação com diferentes concentrações do óleo essencial de Palmarosa (*C.*
 396 *martinii*) e com o fungicida Cercobin®.

397

398 As concentrações inibitórias de 50% do crescimento micelial (ED_{50}),
 399 concentrações mínima inibitória (CMI) e o efeito fungicida podem ser observados na
 400 Tabela 2. O menor ED_{50} observado foi para os óleos essenciais de *C. citratus* e *C.*
 401 *martini*, com concentrações de 0,28 e 0,29 $\mu\text{l.mL}^{-1}$. A CMI para estes óleos e do óleo
 402 essencial de *A. citriodora* foi verificada na dose de 0,8 $\mu\text{l.mL}^{-1}$, sendo a menor dose
 403 que inibiu totalmente o desenvolvimento fúngico do patógeno dentre as doses
 404 aplicadas no estudo. Efeito fungicida foi verificado nos óleos essenciais de *C. citratus*
 405 e *C. martinii* em ambas doses de 0,8 e 1,0 $\mu\text{l.mL}^{-1}$.

406

407 Em estudo com o óleo essencial de *Salvia officinalis* sobre o patógeno *P.*
 408 *expansum in vitro*, Yassir et al. (2015) encontraram a CMI na dose de 2,0 $\mu\text{l.mL}^{-1}$ em
 409 um período de avaliação de sete dias, seguido após de nova avaliação dos discos
 410 miceliais que confirmou o efeito fungicida do óleo essencial e na dose a qual a CMI foi
 detectada.

411

412 Aquino et al. (2014) observaram IVCM nulo com o óleo essencial de *C. citratus*
 sobre o patógeno *Colletotrichum gloesporioides* somente na dose de 5 $\mu\text{l.mL}^{-1}$,

413 enquanto a produção de conídios foi totalmente inibida na concentração de 3 $\mu\text{l.mL}^{-1}$.
 414 Este resultado demonstra como o patógeno no presente estudo é mais sensível à
 415 ação dos óleos essenciais, já que as concentrações inibitórias foram observadas em
 416 doses notoriamente menores.

417
 418 Tabela 2. Equações de regressão, valores de ED_{50} em $\mu\text{l.mL}^{-1}$ (concentração inibitória
 419 de 50% do crescimento micelial), concentração mínima inibitória em $\mu\text{l.mL}^{-1}$ (MIC),
 420 efeito fungicida e respectivas doses, quando encontrado.

Óleo Essencial	Eq. Regressão	ED_{50}	CMI	E. Fungicida
				$\mu\text{l.mL}^{-1}$
<i>A. citriodora</i>	$y = 102,15x + 11,68$	0,38	0,8	N.E.
<i>A. hatschbachii</i>	$y = 75,32x + 10,8$	0,52	>1,0	N.E.
<i>C. citratus</i>	$y = 92,66x + 23,59$	0,28	0,8	0,8; 1,0
<i>C. martinii</i>	$y = 93,99x + 22,62$	0,29	0,8	0,8; 1,0
<i>C. winterianus</i>	$y = 97,15x + 12,13$	0,39	1,0	N.E.

421
 422 N.E.= Não Encontrado

423
 424 Os óleos essenciais atuam em vários níveis dependendo dos componentes e
 425 da concentração do óleo essencial (Krzyśko-Łupicka; Sokół; Piekarska-Stachowiak,
 426 2020), no entanto os mecanismos de ação dos óleos essenciais no combate fúngico
 427 ainda não estão totalmente elucidado, porém algumas pesquisas evidenciam sítio de
 428 ação em organelas e membranas do patógeno, causando distúrbios ou afetando
 429 estruturas, seja na membrana celular, mitocôndrias, conteúdo de ergosterol ou/e DNA
 430 (Nazzaro et al., 2017; D'agostino et al., 2019) ou também através de efeito indireto,
 431 desencadeando efeito elicitor por meio da ativação da imunidade inata na planta
 432 (acúmulo de ERO's, indução de genes de defesa, reforço da parede celular, morte
 433 celular programada, etc) (Rienth et al., 2019).

434 Um dos mecanismo de ação mais relatados na atualidade possui interação com
 435 o ergosterol, o qual é um importante componentes da membrana plasmática dos
 436 fungos. Este lipídio possui fundamental importância para manter a integridade e
 437 fluidez da membrana celular (Kalagatur et al., 2018). Nazzaro et al. (2017) destaca
 438 que quando a biossíntese de ergosterol é afetada ou quando há a destruturação deste,
 439 a membrana plasmática perde sua integridade. Além do mais, destaca que inibição
 440 na formação da parede celular - através do bloqueio da formação de β -glucanas,

441 inibição da função da cadeia de transportes de elétrons mitocondrial e a inibição da
442 bomba de efluxo celular - responsável pela remoção de substâncias tóxicas de dentro
443 das células vivas, são alguns mecanismos de ação dos óleos essenciais e de seus
444 componentes.

445 A quantidade de ergosterol em amostra fúngica do patógeno *Fusarium*
446 *gramineae*, após tratamentos *in vitro* do óleo essencial de *C. martinii*, apresentou
447 diminuição ao passo que as doses do óleo essencial foram aumentadas (Kalagatur
448 et al., 2018).

449 Os componentes citral e geraniol investigados por Tang et al. (2018),
450 evidenciaram que possuíam modo de ação alterando a permeabilidade da membrana
451 celular, o que levava ao acúmulo de ERO's e por sua vez interferindo em genes
452 importantes.

453 A capacidade inibitória dos diferentes óleos essenciais e respectivas
454 concentrações sobre a produção de esporos encontra-se na Tabela 3. Dos cinco óleos
455 essenciais avaliados, quatro apresentaram produção de esporos somente até a dose
456 de 0,4 $\mu\text{l.mL}^{-1}$. Apenas o óleo essencial de *A. hatschbachii* apresentou produção de
457 esporos até a dose de 0,8 $\mu\text{l.mL}^{-1}$. Na dose de 1,0 $\mu\text{l.mL}^{-1}$ houve somente reduzido
458 crescimento de micélio cotonoso branco. Estes dados confirmam que apesar do óleo
459 essencial de *A. hatschbachii*, quando comparado aos outros, apresentar reduzida
460 eficiência no controle fúngico *in vitro*, há também em sua composição, constituintes
461 provavelmente minoritários, responsáveis pelo efeito fungitóxico.

462

463 Tabela 3. Concentração de esporos ($10^4 \cdot \text{mm}^{-2}$) em função das doses dos diferentes
 464 óleos essenciais estudados e respectiva equação de regressão, submetida a análise
 465 de variância a 5% de probabilidade.

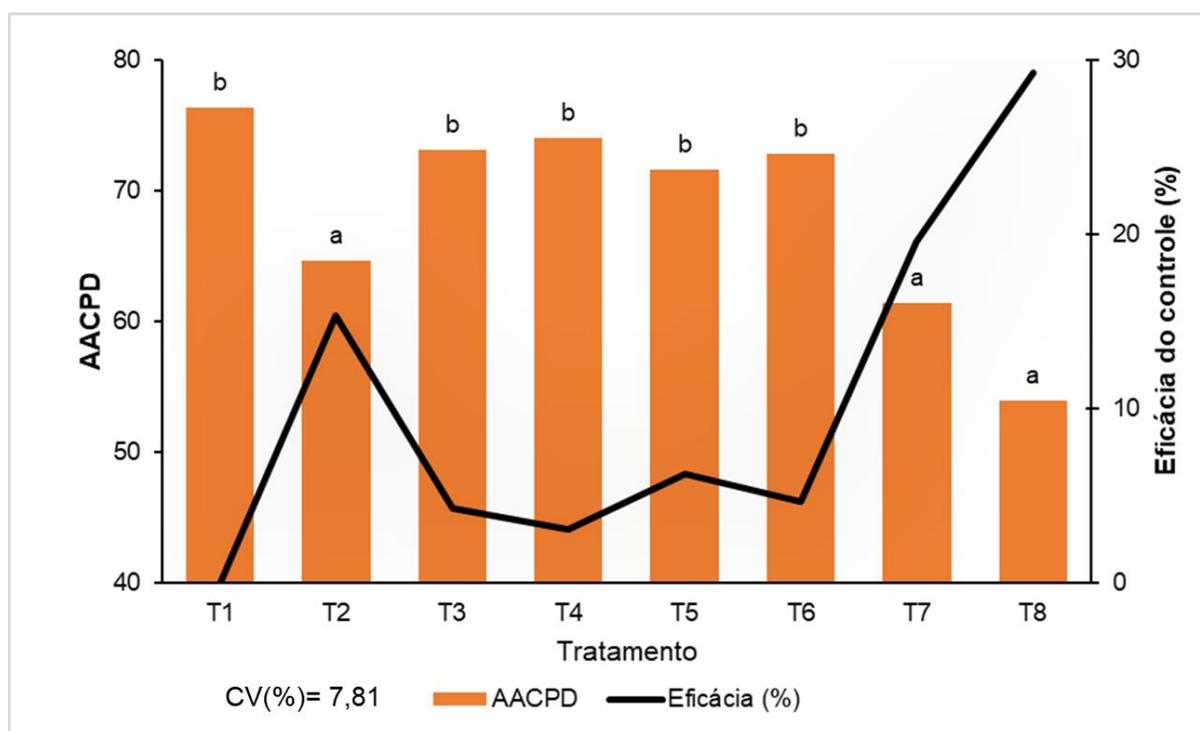
Concentração de esporos $\times 10^4 \cdot \text{mm}^{-2}$							
O.E. Doses ($\mu\text{l} \cdot \text{mL}^{-1}$)						Eq. Regressão	R ²
0,0	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0		
<i>A. citriodora</i>							
190,8	86,1	30,6	0	0	0	$Y = -2666943x^3 + 7334186x^2 - 6570671x + 1908332$	0,999
<i>A. hatschbachii</i>							
195,9	121,9	23,09	1,25	0,25	0	$Y = 3392607x^2 - 5344557x + 1999033$	0,9790
<i>C. citratus</i>							
135,1	39,11	4,39	0	0	0	$Y = -4447613x^3 + 9434562x^2 - 6339543x + 1342445$	0,9982
<i>C. martinii</i>							
135,1	58,49	12,19	0	0	0	$Y = -2516457x^3 + 6312084x^2 - 5149724x + 1358393$	0,999
<i>C. winterianus</i>							
126,00	49,93	29,8	0	0	0	$Y = -1867389x^3 + 4858696x^2 - 4237555x + 1240370$	0,9864

466

467

468 A partir da avaliação diária da severidade de podridão bolor azul nos frutos de
 469 maçã, calculou-se a área abaixo da curva de progresso de doença (AACPD) para
 470 todos os tratamentos e a eficácia do controle, em comparação com o tratamento
 471 testemunha (Figura 3). O tratamento com aspersão da solução com óleo essencial de
 472 *C. martinii* na dose de $4 \mu\text{l} \cdot \text{mL}^{-1}$ (Tratamento T8) foi o tratamento que mais se
 473 destacou perante todos (Foto 4), apresentando a menor AACPD (53,9) e maior
 474 eficácia no controle (29,3%) em comparação com o tratamento testemunha. No
 475 entanto, este tratamento não se diferenciou estatisticamente do tratamento T7 - *C.*
 476 *martinii* na dose de $0,8 \mu\text{l} \cdot \text{mL}^{-1}$ (AACPD = 61,4 e eficácia no controle = 19,6%) e nem
 477 do tratamento T2, com fungicida Cercobin[®] (AACPD = 64,7 e eficácia no controle =
 478 15,4%).

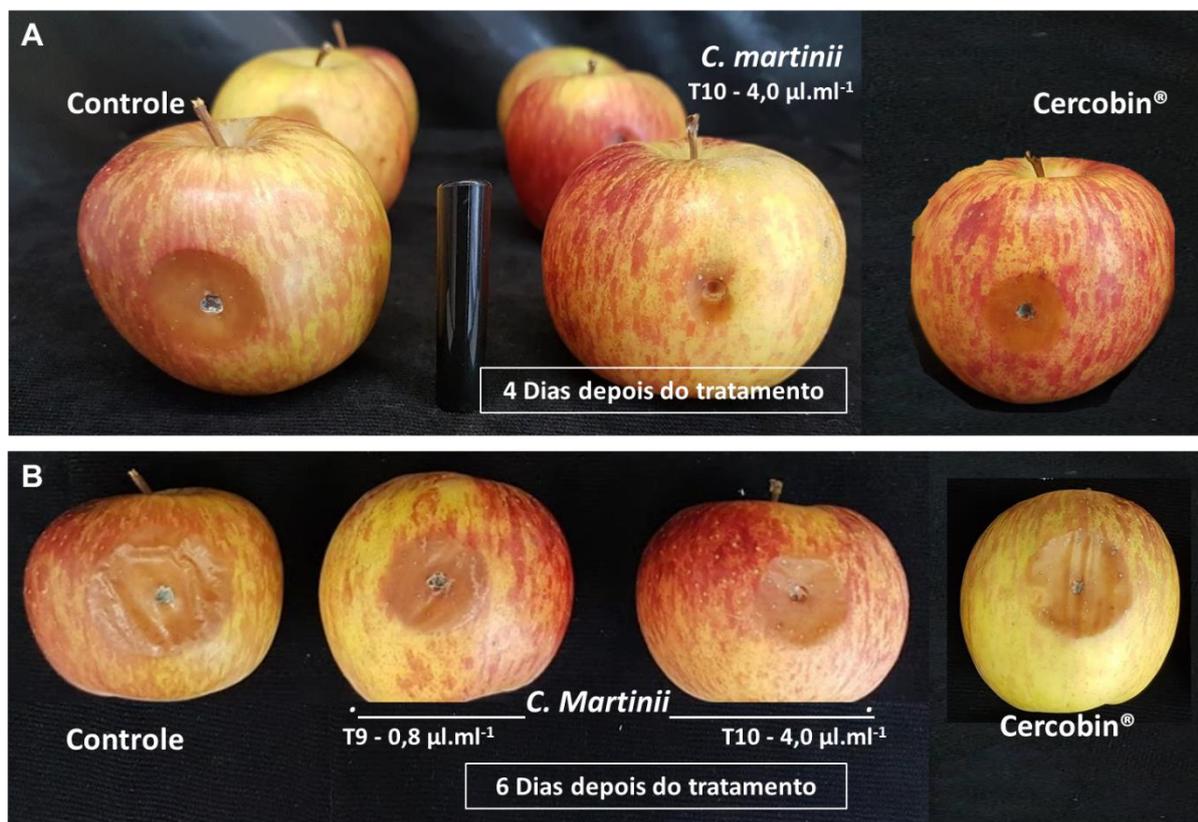
479 Para os demais tratamentos com óleo essencial, não houve diferença
 480 estatística quando comparado com o tratamento testemunha (AACPD = 73,4).



481
 482 Figura 3. Área abaixo da curva de progresso de doença (AACPD) e eficácia do
 483 controle (%) em frutos de maçãs tratados com diferentes tratamentos.

484 Abreviações dos respectivos tratamentos: T1- Controle; T2- tratamento com fungicida Cercobin® 700
 485 WP na concentração de 70 g do p.c. /100 L; T3- OE. de *A. citriodora* 0,8 $\mu\text{l.mL}^{-1}$; T4- OE. de *A. citriodora*
 486 4,0 $\mu\text{l.mL}^{-1}$; T5- OE. de *C. citratus* 0,8 $\mu\text{l.mL}^{-1}$; T6- OE. de *C. citratus* 4,0 $\mu\text{l.mL}^{-1}$; T7- OE. de *C. martinii*
 487 0,8 $\mu\text{l.mL}^{-1}$; T8- OE. de *C. martinii* 4,0 $\mu\text{l.mL}^{-1}$. Os dados de AACPD foram submetidos ao teste
 488 estatístico Skott-knott, a 5% de probabilidade de erro. Letras iguais indicam que não há diferença
 489 estatística significativa.
 490

491 Os efeitos inibitórios do desenvolvimento fúngico foram mais notórios nos
 492 testes *in vitro* quando comparado com os testes nos frutos, resultados obtidos também
 493 por outros autores (Vieira et al., 2018; Schao et al., 2015). Vieira et al. (2018) relataram
 494 que os quatro óleos essenciais utilizados *in vitro* (citronela, alecrim, cravo e alho) no
 495 controle do patógeno *P. expansum* e em maçãs Fuji' inoculadas, apresentaram
 496 resultados mais evidentes no estudo *in vitro* do que nos experimentos com os frutos,
 497 apesar do diâmetro das lesões também reduzirem em relação ao tratamento controle.
 498 Os autores relataram que após cinco dias em temperatura ambiente, os frutos
 499 artificialmente inoculados com o patógeno apresentaram redução de 26 e 35% do
 500 crescimento, nos tratamentos a 100 e 500 $\mu\text{l.L}^{-1}$ de óleo essencial, respectivamente,
 501 pelo método de volatilização do óleo essencial em container plástico selado.
 502



503

504 Figura 4. Inibição da podridão bolor azul em maçãs 'Fuji' inoculadas com o patógeno
 505 *Penicillium expansum*, 4 (A) dias e 6 (B) dias, respectivamente, após a aplicação de
 506 diferentes tratamentos.

507

508 Em maçãs 'Golden Delicious' Taş e Karaca (2015) observaram inibição média
 509 de 54,9% no desenvolvimento de bolor azul em comparação ao controle, sete dias
 510 após a inoculação do patógeno *P. expansum*, incubado sob volatilização com óleo
 511 essencial de orégano, em quatro diferentes doses (1,0; 2,5; 5,0 e 10,0 µL), sendo que
 512 na dose de 10 µL houve inibição de 87,5% no desenvolvimento de bolor azul, ao passo
 513 que o fungicida Thiabendazole inibiu 100% do desenvolvimento.

514 O tempo após aplicação dos tratamentos também pode surtir efeito no controle
 515 das podridões. Neri; Mari e Brigati (2006) realizaram aplicação de compostos
 516 aromáticos isolados para o controle de bolor azul em peras cv. Conference, inoculadas
 517 com isolado do patógeno *P. expansum* resistente a tiabendazol e trataram os frutos
 518 por volatilização em diferentes tempos após a inoculação do patógeno (2 e 24 horas
 519 após inoculação), onde o composto *trans*-2-Hexenal (concentração de 12,5 µL L⁻¹)
 520 apresentou o melhor controle quando aplicado 24 horas após a inoculação do

521 patógeno, enquanto os frutos tratados 2 horas após não diferenciaram-se do
522 tratamento controle.

523 A acidez (% ácido málico) e os sólidos solúveis totais – SST (°Brix) foram
524 avaliados ao final dos experimentos (Tabela 4). Para ambas variáveis não houve
525 diferença estatística significativa entre os tratamentos aplicados, denotando que não
526 houve influência dos tratamentos nestes atributos qualitativos dos frutos.

527 Os atributos de qualidade de maçãs ‘Fuji’ após tratamento com óleos
528 essenciais em trabalho de Vieira et al. (2018) também não foram influenciados pela
529 adição dos óleos essenciais.

530

531 Tabela 4. Acidez titulável (% ácido málico) e sólidos solúveis totais – SST (°Brix) em
532 maçãs cultivar “Fuji” nos diferentes tratamentos, submetidos ao teste estatístico
533 Skott-knott, a 5% de probabilidade de erro.

Tratamento	Acidez Titulável (% ácido málico)	SST (°Brix)
Testemunha	0,25 a	14,12 a
Fungicida	0,25 a	14,27 a
O.E. <i>Aloysia c. D1</i>	0,24 a	12,92 a
O.E. <i>Aloysia c. D2</i>	0,26 a	13,67 a
O.E. <i>C. citratus D1</i>	0,26 a	14,22 a
O.E. <i>C. citratus D2</i>	0,26 a	13,17 a
O.E. <i>C. martinii D1</i>	0,25 a	13,90 a
O.E. <i>C. martinii D2</i>	0,29 a	13,82 a
CV(%)	16,17	6,63

534

535 4.4 Conclusão

536

537 Todos os óleos essenciais apresentam efeito fungitóxico contra o patógeno *P.*
538 *expansum* quando avaliado *in vitro*, no entanto os melhores resultados foram obtidos
539 com os óleos essenciais de *A. citriodora*, *C. citratus* e *C. Martinii*, pois estes
540 necessitam de menores concentrações para inibir totalmente o crescimento fúngico.
541 Destes, *C. citratus* e *C. martinii* tendem a possuir maior potencialidade no controle,
542 tendo em vista que foi verificado efeito fungicida nas doses testadas.

543 Para o tratamento direto com os frutos e no período de avaliação testado, a
544 solução aplicada com o óleo essencial de *C. martinii* mostrou-se promissora,

545 reduzindo a incidência da podridão nos frutos e possuindo maior eficiência no controle
546 da podridão do que o tratamento com fungicida, no entanto maiores estudos sobre
547 atributos qualitativos, formas e períodos de armazenamento devem ser pesquisados
548 em próximos estudo.

549

550 **5. Referências bibliográficas**

551

552 Alfenas, A. C.; Zauza, E. A. V.; Mafia, R. G. (2007) Produção, Determinação e
553 Calibração da Concentração de Inóculo em Suspensão. In: ALFENAS, A. C.; Mafia,
554 R. G. (Ed.). Métodos em fitopatologia. Viçosa: UFV, 2007. p. 103-116.

555

556 Aquino, C.F., Sales, N.L.P., Soares, E.P.S., Martins, E.R., & Costa, C.A.. (2014).
557 Composição química e atividade in vitro de três óleos essenciais sobre *Colletotrichum*
558 *gloeosporioides* do maracujazeiro. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, 16(2,
559 Suppl. 1), 329-336. https://dx.doi.org/10.1590/1983-084X/12_115

560

561 Baraldi, E., Mari, M., Chierici, E., Pondrelli, M., Bertolini, P. and Pratella, G. (2003),
562 Studies on thiabendazole resistance of *Penicillium expansum* of pears: pathogenic
563 fitness and genetic characterization. *Plant Pathology*, 52: 362-
564 370. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2003.00861>

565

566 Brum, R. B. C. S.; de Castro, H. G.; Cardon, C. H.; Pereira, A. S.; Cardoso, D. P.;
567 Rodrigues dos Santos, G. (2014) Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre
568 fungos fitopatogênicos. *Magistra online, Cruz das Almas – BA, V. 26, n.3, p. 361 - 371,*
569 *Jul./Set. 2014.* <https://magistraonline.ufrb.edu.br/index.php/magistra/article/view/471>.

570

571 D'Agostino, M. et al. (2019). Essential Oils and Their Natural Active Compounds
572 Presenting Antifungal Properties. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(20), 3713.

573

574 FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2020) Top 10 Country
575 Production of Apples. Acesso em 15 de janeiro de 2021 em:
576 http://www.fao.org/faostat/en/#rankings/countries_by_commodity

577

- 578 Falleiros de Pádua, R. A.; Machinski, J. M. (2005). Aspectos toxicológicos e
579 ocorrência de patulina em suco de maçã. *Semina: Ciências Agrárias* [en linea]. 26(4),
580 535-541[fecha de Consulta 13 de Enero de 2021]. ISSN: 1676-546X.
- 581 Fontana, D.C.; Neto, D.D.; Pretto, M.M.; et al., Using essential oils to control diseases
582 in strawberries and peaches, *International Journal of Food Microbiology* (2020),
583 <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108980>
- 584 Fontes, L. C. B.; Sarmiento, S. B. S.; Spoto, M. H. F.; Dias, C. T. S. (2008) Conservação
585 de maçã minimamente processada com o uso de películas comestíveis. *Ciênc.*
586 *Tecnol. Aliment.*, Campinas, 28(4): 872-880, out.-dez. 2008. Recuperado em
587 <https://www.scielo.br/pdf/cta/v28n4/a17v28n4.pdf>
- 588 Frisvad, J. C.; Samson, R. A. (2004). Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus
589 *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and
590 their mycotoxins. *Studies in Mycology* 49: 1-174.
- 591
- 592 Gonçalves, A.H., Pereira, A.S., Santos, G.R.S., & Guimarães, L.G.L.. (2015). Atividade
593 fungitóxica in vitro dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* Cham., *Cymbopogon*
594 *citratus*(D.C.) Stapf. e de seus constituintes majoritários no controle de *Rhizoctonia*
595 *solani* e *Sclerotium rolfsii*. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, 17(4, Suppl. 3),
596 1007-1015. https://dx.doi.org/10.1590/1983-084x/14_166
- 597
- 598 Kabelitz, T., Hassenberg, K. (2018). Control of apple surface microflora for fresh-cut
599 produce by post-harvest hot-water treatment, *LWT - Food Science and*
600 *Technology*, 2018 Vol.98 pp.492-499. doi: 10.1016/j.lwt.2018.08.062.
601 <https://daneshyari.com/article/preview/10130475.pdf>
- 602
- 603 Kalagatur, N. K. et al. (2018). Antifungal Activity of Chitosan Nanoparticles
604 Encapsulated With *Cymbopogon martinii* Essential Oil on Plant Pathogenic
605 Fungi *Fusarium graminearum*. *Frontiers in pharmacology*, 9, 610.
606 <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00610>
- 607
- 608 Krzyśko-Łupicka, T.; Sokół, S.; & Piekarska-Stachowiak, A. A. (2020). Evaluation of
609 Fungistatic Activity of Eight Selected Essential Oils on Four

610 Heterogeneous *Fusarium* Isolates Obtained from Cereal Grains in Southern
611 Poland. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(2), 292.

612
613 Mendes, L.; Bresolin, J.; Assis, O.; Britto, D. (2016). Avaliação in vitro da ação da
614 quitosana e de seu derivado quaternizado na inibição do crescimento do fungo
615 *Penicillium expansum*. *Revista Brasileira de Engenharia de Biosistemas*. 10. 116.
616 10.18011/bioeng2016v10n1p11-128.

617
618 Nascimento, J. M.; Serra, A. P.; Bacchi, L. M.; Gavassoni, W. L.; Vieira, M. C.
619 Inibição do crescimento micelial de *Cercospora calendulae* Sacc. por extratos de
620 plantas medicinais. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v.15, n.4, p.751-756,
621 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/s1516-05722013000500016>>. doi:
622 10.1590/s1516-05722013000500016

623
624 Nazzaro, F., Fratianni, F., Coppola, R., & Feo, V. (2017). Essential Oils and Antifungal
625 Activity. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 10(4), 86.
626 <https://doi.org/10.3390/ph10040086>

627
628 Neri, F., Mari, M. and Brigati, S. (2006), Control of *Penicillium expansum* by plant
629 volatile compounds. *Plant Pathology*, 55: 100-105. [https://doi.org/10.1111/j.1365-](https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2005.01312.x)
630 [3059.2005.01312.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2005.01312.x)

631
632 Oliveira, J. A. Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento
633 de plântulas de pepino (*Cucumis sativas* L.) e pimentão (*Capsicum annanum* L.).
634 1991. 111 f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Escola Superior de
635 Agricultura de Lavras, Lavras, 1999.

636 Rienth M, Crovadore J, Ghaffari S, Lefort F (2019) Oregano essential oil vapour
637 prevents *Plasmopara viticola* infection in grapevine (*Vitis Vinifera*) and primes plant
638 immunity mechanisms. doi.org/10.1371/journal.pone.0222854

639
640 Rocha Neto, A. C.; Di Piero, R. M. (2013). Controle do bolor azul em frutos de maçã
641 imersos em Solução de ácido salicílico. *Biosci. J.,Uberlândia*, v. 29, n. 4, p. 884-891,
642 July/Aug. 2013.
643 <http://www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/view/15055/12897>

- 644
645 Sapelli, K. S., Faria, C. M. D. R., & Botelho, R. V. (2020). Postharvest conservation of
646 peaches with the use of edible coatings added with yerba mate extract. *Brazilian*
647 *Journal of Food Technology*, 23, e2019044. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.04419>
648
- 649 SHAO, X.; CAO, B.; XU, F.; XIE, S.; YU, D.; WANG, H. (2015) Effect of postharvest
650 application of chitosan combined with clove oil against citrus green mold. *Postharvest*
651 *Biology and Technology*, v.99, p.37-43.. DOI:
652 10.1016/j.postharvbio.2014.07.014. ([https://www.sciencedirect.com/science/article/pii](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925521414002208)
653 [/S0925521414002208](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925521414002208))
654
- 655 Shaner, G.; Finney, R. E. (1977). Effect of Nitrogen Fertilization on Expression of Slow-
656 Mildewing Resistance in Knox Wheat. *Phytopathology*, Saint Paul, v. 67, n. 8, p.
657 1051-1056, 1977. [https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Doc](https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1977Articles/Phyto67n08_1051.PDF)
658 [uments/1977Articles/Phyto67n08_1051.PDF](https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1977Articles/Phyto67n08_1051.PDF)
659
- 660 Tang, X., Shao, Y. L., Tang, Y. J., & Zhou, W. W. (2018). Antifungal Activity of Essential
661 Oil Compounds (Geraniol and Citral) and Inhibitory Mechanisms on Grain Pathogens
662 (*Aspergillus flavus* and *Aspergillus ochraceus*). *Molecules (Basel, Switzerland)*, 23(9),
663 2108.
664
- 665 Taş, L. & Karaca, G. (2015). Effects of Some Essential Oils on Mycelial Growth of
666 *Penicillium expansum* Link and Blue Mold Severity on Apple. *Asian Journal of*
667 *Agriculture and Food Sciences*. 3. 643.
668 [https://www.researchgate.net/publication/299398199_Effects_of_Some_Essential_Oi](https://www.researchgate.net/publication/299398199_Effects_of_Some_Essential_Oils_on_Mycelial_Growth_of_Penicillium_expansum_Link_and_Blue_Mold_Severity_on_Apple)
669 [ls_on_Mycelial_Growth_of_Penicillium_expansum_Link_and_Blue_Mold_Severity_o](https://www.researchgate.net/publication/299398199_Effects_of_Some_Essential_Oils_on_Mycelial_Growth_of_Penicillium_expansum_Link_and_Blue_Mold_Severity_on_Apple)
670 [n_Apple](https://www.researchgate.net/publication/299398199_Effects_of_Some_Essential_Oils_on_Mycelial_Growth_of_Penicillium_expansum_Link_and_Blue_Mold_Severity_on_Apple)
671
- 672 Vieira, A. M. F. D.; Steffens, C. A.; Argenta, L. C.; Amarante, C. V. T.; Oster, A. H.;
673 Casa, R. T.; Amarante, A. G.; Mortari, & Espíndola, B. P. (2018). Essential oils for the
674 postharvest control of blue mold and quality of 'Fuji' apples. *Pesquisa Agropecuária*
675 *Brasileira*, 53(5), 547-556. <https://dx.doi.org/10.1590/s0100-204x2018000500003>
676

677 Yan, J., Wu, H., Shi, F., Wang, H., Chen, K., Feng, J., & Jia, W. (2020). *Antifungal*
678 *activity screening for mint and thyme essential oils against Rhizopus stolonifer and*
679 *their application in postharvest preservation of strawberry and peach fruits. Journal of*
680 *Applied Microbiology*. doi:10.1111/jam.14932

681
682 Yassir, El & Manssouri, M. & Bouyanzer, A. & Majidi, Lhou & Lahhit, N. & Hajar,
683 Bendaif & Costa, Jean & Chetouani, A. & Elmsellem, Hicham & Hammouti, B.. (2015).
684 *Essential oil composition and antifungal activity of Salvia officinalis originating from*
685 *North-East Morocco, against postharvest phytopathogenic fungi in apples. Der Pharma*
686 *Chemica*, 2015, 7(9):95-102

687

688

5. ARTIGO 3 - CONTROLE DE PODRIDÕES PÓS-COLHEITA DE MAÇÃS 'TOPAZ' EM DIFERENTES TECNOLOGIAS DE ARMAZENAMENTO

CONTROL OF POST-HARVEST ROTS ON 'TOPAZ' APPLES UNDER DIFFERENT STORAGE TECHNOLOGIES

Resumo

Podridões pós-colheita são um dos principais fatores limitantes no armazenamento de maçãs, principalmente em frutas produzidas de forma orgânica. Podridões olho de boi e bolor azul destacam-se como as duas principais podridões no período de armazenamento, sendo o controle destas doenças um desafio para a cadeia produtiva. Sendo assim, este estudo teve o objetivo de investigar a eficácia do uso de diferentes tratamentos na redução da incidência de podridões e na manutenção da qualidade de maçãs orgânicas 'Topaz', armazenadas em atmosfera controlada (AC) e em armazenamento refrigerado (AR). Maçãs 'Topaz' produzidas de forma orgânica foram submetidas a nove (9) tratamentos pós-colheita e armazenadas sob AR e CA por quatro e seis meses, respectivamente. Os nove tratamentos foram: (1) controle; (2) tratamento térmico com água quente (HW) a 52°C e por 2 min.; (3) HW mais 8% CaCl₂; (4) HW mais 12% CaCl₂; (5) HW mais 4% bicarbonato de sódio; (6) óleo essencial (EO) de *Cymbopogon winterianus*; (7) EO de *Corymbia citriodora*; (8) EO de *Cymbopogon citratus* e (9) fungicida Pyrimethanil. O tratamento água quente mais adição de cloreto de cálcio em 8 e 12% mantiveram a firmeza da polpa dos frutos armazenados em AR e apresentaram entre si correlação positiva ($r=0,92$), no entanto desordens fisiológicas foram observadas. O tratamento térmico mais bicarbonato de sódio apresentaram os menores índices de podridão, porém características indesejáveis como redução da firmeza da polpa e frutos com aspectos murchos foi o principal efeito negativo observado, seguido de frutos com necroses. Tratamentos com óleos essenciais apresentaram fitotoxicidade, o que conduziu a intensa podridão dos frutos, principalmente em AR. Já os tratamentos água quente e tratamento com fungicida reduziram a incidência de podridões e mantiveram a qualidade dos frutos durante o armazenamento.

Palavras-chaves: *Malus domestica*, atmosfera controlada, *Penicillium expansum*, *Neofabraea* spp.

Abstract

Abstract: Post-harvest rots are one of the main limiting factors during the long-term storage of apples, especially in organically produced fruits. Bull's eye rot and blue mould stand out as the two main causes of storage rot, and the control of these diseases remains a challenge for the production chain. Thus, this study aimed to investigate the efficacy of different post-harvest treatments in reducing the incidence of rots and maintaining the quality of organic 'Topaz' apple stored under controlled atmosphere (CA) and regular air (RA). Organically produced 'Topaz' apple were subjected to nine (9) postharvest treatments and stored under RA and CA for four and six months, respectively. The nine treatments were: (1) control; (2) hot water (HW) dipping at 52°C and 2 min.; (3) HW plus 8% CaCl₂; (4) HW plus 12% CaCl₂; (5) HW plus 4% sodium bicarbonate; (6) essential oil (EO) of *Cymbopogon winterianus*; (7) EO of *Corymbia citriodora*; (8) EO of *Cymbopogon citratus* and (9) fungicide Pyrimethanil. The hot water treatment plus the addition of 8 and 12% calcium chloride maintained the firmness of the pulp in RA-stored fruit and showed a positive correlation with each other ($r=0.92$, $p < 0.05$), however, high incidences of physiological disorders were observed. The thermal treatment plus sodium bicarbonate had the lowest incidence of rot, however, these fruit had undesirable quality characteristics such as reduced pulp firmness, wilted fruit and skin necrosis. Fruit treated with essential oils showed signs of phytotoxicity, which led to high rates of fruit rot, particularly for RA-stored fruit. The hot water and fungicide treatments reduced the incidence of rot and maintained fruit quality during storage.

Key-words: *Malus domestica*, controlled atmosphere, *Penicillium expansum*, *Neofabraea* spp.

5.1 INTRODUÇÃO

Podridões pós-colheita de frutas e vegetais contribuem para a redução do período de armazenamento do produto, além de causarem deteriorização de nutrientes, contaminação por micotoxinas e perda do produto perante o mercado (MARI; BAUTISTA-BAÑOS; SIVAKUMAR, 2015). Na pós-colheita de maçãs, os fungos *Neofabraea* sp., syn. *Gloeosporium* (NEUWALD; KITTEMANN, 2016), causador da podridão olho de boi, e *Penicillium expansum*, causador da podridão bolor azul, são tidos como os dois mais comuns patógenos de armazenamento para a cultura (WASSERMANN et al., 2019). Grantina-Levina (2015) destaca que a incidência de diferentes agentes patogênicos pode variar conforme a cultivar, do clima durante a estação de cultivo e das práticas agrícolas, sejam elas visando a produção orgânica de frutas ou a produção integrada.

Possuir uma gama mais ampla de métodos de controle de podridões durante a conservação de frutas é de interesse de toda a cadeia produtiva, seja para auxiliar na diminuição da pressão de seleção a patógenos resistentes a fungicidas, prolongando desta forma a viabilidade e efeito destes, como também possibilitar maiores possibilidades de controle para os produtores orgânicos.

Diferentes métodos para o controle de podridões em maçãs são relatados por pesquisadores, como Kabelitz e Hassenberg, (2018) e Maxin et al., (2012), que constataram que o tratamento térmico com água quente mostrou-se eficaz no controle de podridões mantendo a qualidade dos frutos.

Tratamentos com óleos essenciais apresentaram efeitos inibitórios no crescimento fúngico e mostraram-se promissores quando aplicados em maçãs (TAŞ; KARACA, 2015), resultado explicado pelos efeitos dos compostos aromáticos que podem afetar tanto funções vitais nos fungos, como integridade e permeabilidade das membranas fúngicas, assim como induzir genes de resistência nos frutos (NAZZARO et al., 2017; RIENTH et al., 2019).

Em outros estudos, tratamentos com cloreto de cálcio promoveram o aumento da firmeza da polpa de maçãs ‘Golden Delicious’ com doses de 3 e 4%, retardando senescência e controlando desordens fisiológicas (POOVAIAH, 1986). Kitemann et al. (2010) observaram também diminuição da respiração e da produção de etileno. A aplicação de cálcio em produtos frescos pode ajudar a estabilizar a membrana celular e formar Ca-pectatos, que aumentam a rigidez da lamela média e da parede celular da planta resultando em resistência ao ataque das enzimas de decomposição da parede celular (LUNA-GUZMAN et al., 1999). Em frutos de citrus, Youssef et al. (2014) constataram que com a aplicação de sais de sódio, como

bicarbonato de sódio, mecanismos de defesa nos frutos foram acionados contra *Penicillium digitatum*.

O presente trabalho foi realizado a fim de investigar a eficácia do uso de tratamentos pós colheita na redução da incidência de podridões e na manutenção da qualidade de maçãs ‘Topaz’ conservadas em armazenamento refrigerado e em atmosfera controlada.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

Maçãs da cultivar ‘Topaz’, colhidas em uma área de cultivo orgânico no município de Ravensburg, Alemanha, foram utilizadas neste experimento, colhidas com índice de maturação (também conhecido como índice Streif) de 0,13. O trabalho foi desenvolvido no departamento de pesquisa de Colheita, Armazenamento e Qualidade de Frutas do Centro de Competência em Fruticultura Lago de Constança, em Ravensburg, Alemanha, no período de outubro de 2020 a abril de 2021.

Após a colheita, realizou-se os tratamentos térmicos nos frutos e seguiu-se para o local onde o experimento seria realizado, prosseguindo com a seleção e randomização dos frutos. Frutos com danos mecânicos, tamanho desuniforme e com demais defeitos foram descartados.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, constituído de nove tratamentos e duas formas de armazenamento, com três repetições cada. Cada repetição foi composta por cerca de 80 frutos, alocados em caixas plásticas vazada, de capacidade de 45L.

Os tratamentos contituíntes do experiemento foram os seguintes: T1- Tratamento controle; T2- Fungicida Pembotec® (Pyrimethanil); T3- O.E. (Óleo Essencial) de *Cymbopogon winterianus* – nome popular: citronela (E.O. 1); T4- O.E. de *Corymbia citriodora* – eucalipto cheiroso (E.O. 2); T5- O.E. de *Cymbopogon citratus* – capim-limão (E.O. 3); T6- Água quente; T7- Água quente + Bicarbonato de Sódio (4 %); T8- Água quente + Cloreto de Cálcio (8%); T9- Água quente + Cloreto de Cálcio (12%). Os frutos foram armazenados em ambiente refrigerado e em atmosfera controlada, na temperatura de 1 °C e umidade relativa do ar em entre 92 e 94%, pelo período de quatro e seis meses, respectivamente. O armazenamento em atmosfera controlada possuiu condição de pressão parcial de 1 kPa O₂ e 2.5 kPa CO₂.

Para o tratamento com fungicida os frutos foram mergulhados pelo período de um minuto em calda fúngica com concentração de 125 ml do fungicida Pembotec® 400 SC (150g.L⁻¹ Pyrimethanil) em 100 Litros de água. Para os três óleos essenciais, prosseguiu-se com tratamento de forma igual, mudando apenas os óleos essenciais. Foram utilizados os óleos

essenciais de *Cymbopogon winterianus* – nome popular: citronela; *Corymbia citriodora* – eucalipto cheiroso; *Cymbopogon citratus*– capim-limão. Os frutos foram mergulhados em solução de água com o respectivo óleo essencial na concentração de 1 mL.L^{-1} , pelo período de um minuto. Foi adicionado com a solução, 10 ml do agente surfactante Twenn® 20, para efeito de mais solubilidade e homogeneização do produto em água.

Os tratamentos térmicos foram conduzidos pelo período de tempo de 2 minutos, a temperatura de $52 \text{ }^\circ\text{C}$ em máquina especializada para o tratamento térmico de frutas, marca Burg Machinery, na propriedade do produtor de frutas Nikolaus Glocker, município de Horgenzell. Para o tratamento com água quente sozinho (T6) ou combinado com o produto bicarbonato de sódio utilizou-se a concentração de 4% do produto em água quente (T7). Para os tratamentos com cloreto de cálcio (T8 e T9), foram utilizadas as concentrações de 8 e 12%, respectivamente também em combinação com o tratamento térmico.

As avaliações de qualidade foram realizadas imediatamente após o armazenamento e sete dias de período de prateleira a $20 \text{ }^\circ\text{C}$. Para a firmeza de polpa foi utilizado penetômetro semiautomático (Guess Text Analyzer®; África do Sul) com ponta de 11 mm de diâmetro, sendo o resultado expressado em Newtons (N), na região equatorial dos frutos onde a transição de cor do fruto era visualizado. Suco da metade inferior dos frutos foram obtidos em máquina centrífuga para prosseguir com as análises de acidez titulável (AT) e sólidos solúveis totais (SST). A acidez titulável (AT) foi determinada por titulação em Unidade Tituladora (Metrohm® AG, EUA) com 0,1 N NaOH de uma solução com 10 mL de suco diluído em 50 mL de água destilada até atingir o pH 8,1; sendo os dados de AT expressos em mili equivalente. 100mL^{-1} de suco. Os sólidos solúveis totais (SST) foram determinados com o uso de refratômetro digital (marca Atago®, modelo PR-32 α , Japão) a partir do mesmo suco utilizado para determinação da AT, e expressos em $^\circ\text{Brix}$. A coloração da casca foi medida através do ângulo hue (h°), na região do fruto com coloração de fundo entre o verde ao amarelo (lado da sombra) que não apresentasse a cor vermelha (coloração de cobertura), obtido com o auxílio de colorímetro (marca Konica Minolta®, modelo CR-300, Japão).

A composição mineral dos frutos com tratamento de cálcio (8 e 12%), de sódio (4%) e tratamento controle foram analisadas no final de cada forma de armazenamento. Os teores de potássio (K), cálcio (Ca), fósforo (P) e magnésio (Mg) foram analisados utilizando espectroscopia de absorção atômica (GBC908AA) seguindo o método de Neuwald et al. (2014), para os quais foram utilizadas por tratamento, três repetições compostas por 20 frutos cada. Os resultados de Ca, K, Mg e P foram expressos em mg de cada elemento/100 g de peso fresco ($\text{mg } 100\text{g}^{-1} \text{ MF}$).

Amostras de frutos para análise de resíduo químico do tratamento com o fungicida Pyrimethanil e do tratamento controle (testemunha) foram enviadas para o laboratório Friedle, Tegernheim próximo Regensburg, Alemanha. Amostras da solução de aplicação do tratamento fungicida também foram enviadas para o mesmo laboratório, sendo obtido ao total três amostras da solução: 1ª amostra no momento inicial da aplicação, 2ª amostra no momento após a finalização da aplicação e 3ª amostra após a neutralização do produto, antes de ser realizado o descarte dos resíduos em local correto de descarte segundo a legislação alemã vigente.

Avaliações de podridões assim como desordens fisiológicas externas foram realizadas na retirada dos frutos do armazenamento e após o período de prateleira. Os valores foram expressados em porcentagem em relação ao total de frutos composto pela amostra.

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANova). Dados em porcentagem foram transformados em $\text{arc seno } \sqrt{x/100}$ para prosseguir com a análise estatística, assim como o índice de doença foram transformados em $\log_{10}(x)$. Médias foram comparadas usando o teste Skott-knott ($p < 0,05$) usando o software estatístico Sisvar. Coeficiente de correlação foi determinado para os parâmetros firmeza de polpa e conteúdo mineral dos frutos segundo método de Karl Pearson. Gráficos e tabelas foram gerados com auxílio do programa Excel.

5.3 RESULTADOS

A coloração (Tabela 1) nos frutos armazenados em ambiente refrigerado apresentaram ° hue mais baixos ou seja mais próxima ao amarelo do que quando comparado aos tratamentos em atmosfera controlada, indicando maturação mais avançada dos frutos.

Os tratamentos térmicos com adição de cloreto de cálcio mantém maior firmeza da polpa dos frutos em ambas as condições de armazenamento (Tabela 1 e Figura 1). Todos os tratamentos submetidos ao armazenamento refrigerado apresentaram firmeza de polpa significativamente menor que os tratamentos em atmosfera controlada e uma grande perda da firmeza de polpa dos frutos pode ser observada entre os tratamentos em ambiente refrigerado em relação ao valor de firmeza de polpa no momento do início do armazenamento (Tabela 1).

Os frutos do tratamento térmico e adição de bicarbonato de sódio apresentavam-se murchos e com certa elasticidade, aspecto ainda mais saliente após período de prateleira, motivo o qual resultou em valores de firmeza de polpa superestimados no momento da avaliação, apresentando valores maiores do que realmente seriam. Ou seja, os valores foram ainda menores de firmeza de polpa que os mensurados.

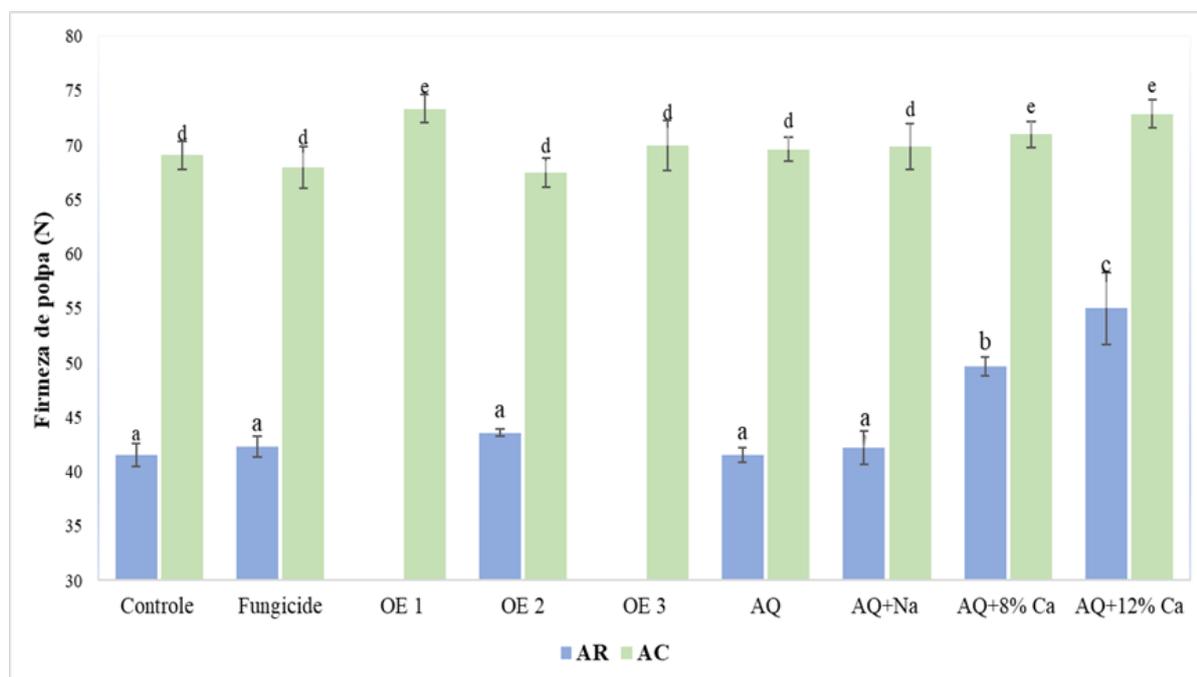
Os sólidos solúveis totais em sua maioria não diferiram entre si, apenas os tratamentos em atmosfera controlada com água quente e adição de 8% e 12% de cloreto de cálcio e o tratamento com o óleo essencial de citronela (E.O. 1) apresentaram sólidos solúveis ligeiramente maior que todos os demais. O armazenamento em atmosfera controlada proporcionou também o menor decréscimo da acidez titulável, mostrando a eficiência da AC em reduzir o metabolismo e desta forma o consumo de ácidos no ciclo de respiração.

Tabela 1 - Atributos de qualidade de maçãs ‘Topaz’ submetidas em diferentes tratamentos, em duas condições de armazenamento, após sete dias de prateleira a 20 °C.

Condição de Armazenamento	Tratamento	Cor da pele (°hue)	Firmeza (N)	SST (°Brix)	AT (mEq/100mL)
Colheita		104,88± 0,30	72,6± 1,3	12,93± 0,12	13,6± 0,29
Atmosfera Controlada (AC)	Controle	101,01± 0,64 c*	69,06± 1,28 d	13,77± 0,12 a	10,07± 0,37 c
	Fungicida	100,81± 0,15 c	67,90± 1,93 d	13,73± 0,05 a	10,17± 0,09 c
	O.E. 1	101,03± 0,84 c	73,33± 1,25 e	14,00± 0,22 b	10,20± 0,37 c
	O.E. 2	101,22± 0,34 c	67,46± 1,35 d	13,6± 0,20 a	9,93± 0,17 c
	O.E. 3	100,59± 0,29 c	69,93± 2,29 d	13,70± 0,08 a	10,00± 0,24 c
	A.Q.	100,26± 1,11 c	69,60± 1,12 d	13,50± 0,09 a	9,93± 0,12 c
	A.Q. + Na	100,1± 0,15 c	69,83± 2,09 d	13,80± 0,36 a	9,56± 0,53 c
	A.Q. + 8% Ca	98,64± 0,51 b	70,96± 1,21 e	14,17± 0,26 b	10,23± 0,31 c
	A.Q. + 12% Ca	99,16± 1,16 b	72,83± 1,28 e	14,27± 0,21 b	10,67± 0,34 c
Armazenamento Refrigerado (AR)	Controle	93,27± 0,45 a	41,53± 1,01 a	13,20± 0,29 a	8,43± 0,21 a
	Fungicida	92,18± 0,79 a	42,30± 0,98 a	13,23± 0,05 a	8,36± 0,17 a
	O.E. 2	91,55± 0,71 a	43,56± 0,31 a	13,63± 0,17 a	9,06± 0,05 b
	A.Q.	91,7± 0,39 a	41,53± 0,69 a	13,43± 0,12 a	8,30± 0,08 a
	A.Q. + Na	92,11± 0,57 a	42,16± 1,53 a	13,53± 0,12 a	8,43± 0,12 a
	A.Q. + 8% Ca	91,31± 1,05 a	49,70± 0,86 b	13,60± 0,29 a	9,07± 0,34 b
	A.Q. + 12% Ca	91,88± 0,87 a	55,00± 0,33 c	13,80± 0,08 a	8,97± 0,26 b

* Médias seguidas com valores de desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística significativa segundo o teste Skott Knott ($p < 0,05$). Fonte: autoria própria.

Figura 1 - Firmeza da polpa de maçãs 'Topaz' submetidas em diferentes tratamentos, em duas condições de armazenamento, após sete dias de prateleira a 20 °C.

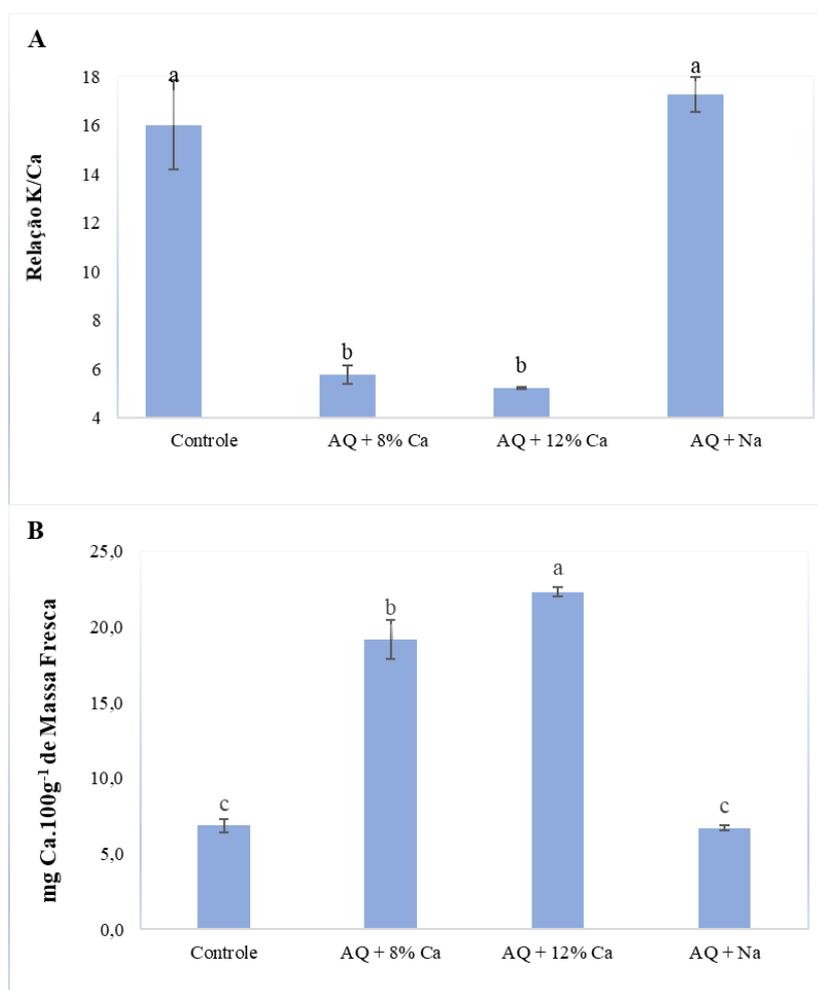


*Linhas sobre cada coluna no gráfico indicam os valores de desvio padrão por tratamento. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa segundo o teste Skott Knott ($p < 0,05$). Observação: E.O. 1 e E.O. 3 sob armazenamento refrigerado não apresentaram unidades experimentais suficientes para prosseguir com a avaliação dos atributos de qualidade.

Abreviações: OE1= Óleo essencial de *C. winterianus*; OE2= Óleo essencial de *C. Citriodora*; OE3= Óleo de *C. Citratus*; AQ= Água Quente; AQ+Na= Água Quente + bicarbonato de sódio; AQ+8%Ca= Água quente + 8% de cloreto de cálcio; AQ+12%Ca= Água quente + 8% de cloreto de cálcio. Fonte: autoria própria.

Os tratamentos com água quente e adição de cloreto de cálcio em ambas concentrações, 8 e 12%, apresentaram aumento significativo do conteúdo de cálcio no tecido dos frutos (Figura 2B), o que leva a uma redução da relação mineral K/Ca dos frutos (Figura 2B). Por outro lado, tratamento com água quente e bicarbonato de sódio não apresentou alterações nos conteúdos minerais dos frutos. Para os demais componentes minerais analisados, Mg, K e P (Tabela 2), não houve diferença na composição mineral dos frutos entre os diferentes tratamentos.

Figura 2 - Relação Potássio/ Cálcio (K/Ca) – Figura 2.A e concentração de cálcio (mg.Ca.100g^{-1} de massa fresca) – Figura 2.B, conforme análise mineral do tecido de maçãs 'Topaz' após armazenamento refrigerado.



Linhas sobre cada coluna no gráfico indicam valores de desvio padrão por tratamento. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa segundo o teste Skott Knott ($p < 0,05$). Observação: análise do conteúdo mineral dos frutos submetidos em atmosfera controlada em andamento. Abreviações: AQ+Na= Água Quente + bicarbonato de sódio; AQ+8%Ca= Água quente + 8% de cloreto de cálcio; AQ+12%Ca= Água quente + 8% de cloreto de cálcio. Fonte: autoria própria.

Tabela 2 - Conteúdo mineral dos frutos submetidos em armazenamento refrigerado, dos componentes minerais Ca, Mg, K, P e Relação K/Ca.

Tratamento	Ca	Mg	K	P	Relação K/Ca
Controle	6,85 ± 0,47 a*	5,44 ± 0,01 a	108,87 ± 6,00 a	9,07 ± 0,73 a	16,01 ± 1,83 b
AQ + Na	6,7 ± 0,15 a	5,36 ± 0,14 a	115,50 ± 2,54 a	9,62 ± 0,23 a	17,25 ± 0,72 b
AQ + 8% Ca	19,17 ± 1,31 b	5,32 ± 0,15 a	110,57 ± 0,31 a	9,35 ± 0,36 a	5,79 ± 0,38 a
AQ + 12% Ca	22,33 ± 0,31 b	5,68 ± 0,19 a	116,73 ± 2,08 a	9,72 ± 0,18 a	5,22 ± 0,03 a

* Médias seguidas com valores de desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística significativa segundo o teste Skott Knott ($p < 0,05$). Observação: análise do conteúdo mineral dos frutos submetidos

em atmosfera controlada em andamento. Abreviações: AQ+Na= Água Quente + bicarbonato de sódio; AQ+8%Ca= Água quente + 8% de cloreto de cálcio; AQ+12%Ca= Água quente + 8% de cloreto de cálcio.

Obs: Valores expressos em $\text{mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ de massa fresca.

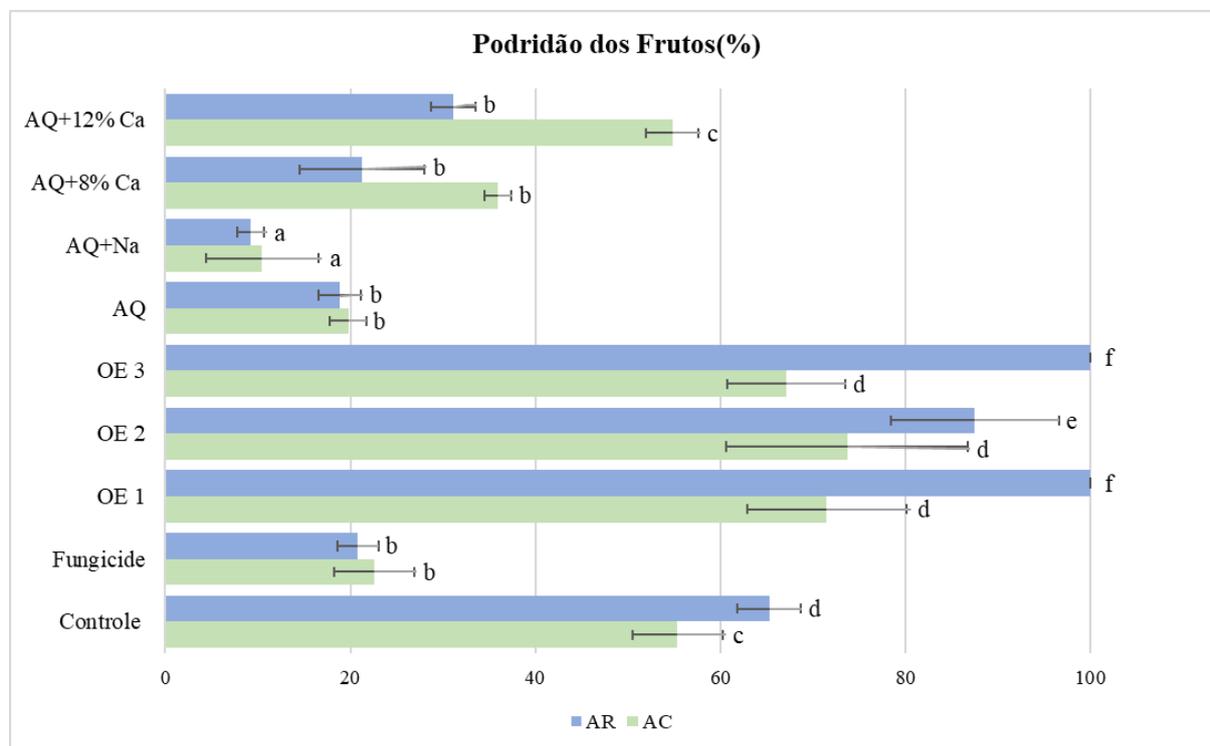
Fonte: autoria própria.

No tratamento controle 55% dos frutos armazenados em atmosfera controlada foram acometidos por podridões, enquanto 65% de podridões foi observado no mesmo tratamento para a condição de armazenamento refrigerado (Figura 3), o que evidencia a alta taxa de ataque por patógenos em maçãs 'Topaz' obtidas através de cultivo orgânico.

O tratamento térmico com a adição de bicarbonato de sódio em ambas condições de armazenamento promoveram a menor incidência de podridão dos frutos (cerca de 10%) dentre todos os tratamentos, diferindo-se estatisticamente de todos os demais (Figura 3 e 4). O tratamento térmico com água quente e o tratamento fungicida Pembotec[®] em ambas as condições de armazenamento apresentaram redução das podridões similar ao tratamento térmico e adição de cálcio.

Os tratamentos térmico com adição de cálcio em atmosfera controlada apresentaram maior incidência de podridão ao comparar com o tratamento em armazenamento refrigerado, porém ambos tratamentos apresentaram considerável incidência de podridão e assim como os tratamentos com os óleos essenciais, estas podridões foram estimuladas a partir de danos primários causadas por desordens fisiológicas na superfície dos frutos pelos respectivos tratamentos, através de corrosões nos tecidos por sais de cálcio e pela fitotoxicidade nos tecidos causada pelos óleos essenciais, o que facilitou a infecção e colonização dos frutos pelos agentes patogênicos (Figura 3 e 4).

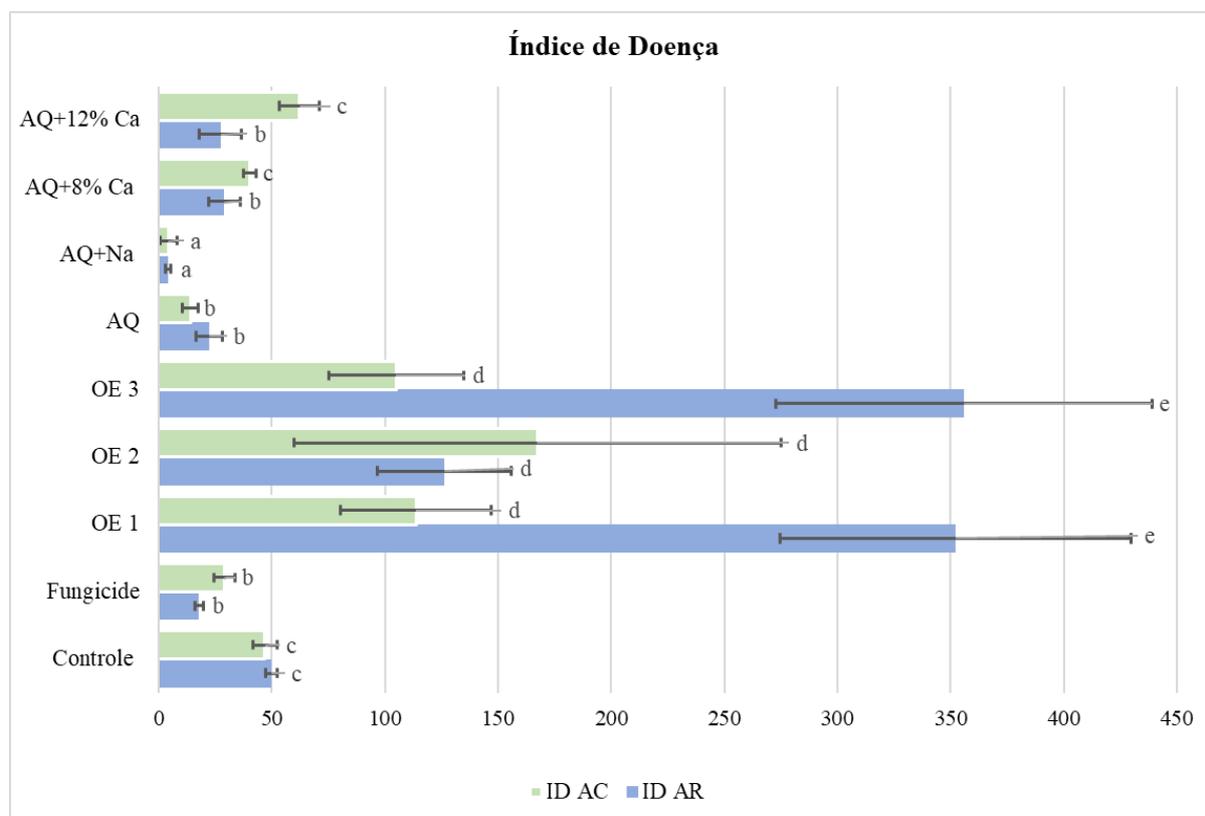
Figura 3- - Incidência final de podridão dos frutos em porcentagem (%) após período de armazenamento e sete dias de prateleira a 20°C.



Linhas sobre cada coluna no gráfico indicam valores de desvio padrão por tratamento. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa segundo o teste Skott Knott ($p < 0,05$). Abreviações: OE1= Óleo essencial de *C. winterianus*; OE2= Óleo essencial de *C. Citriodora*; OE3= Óleo de *C. Citratus*; AQ= Água Quente; AQ+Na= Água Quente + bicarbonato de sódio; AQ+8%Ca= Água quente + 8% de cloreto de cálcio; AQ+12%Ca= Água quente + 8% de cloreto de cálcio. Fonte: autoria própria.

Através da Figura 4, que demonstra o índice de doença, pode-se observar a incidência e a severidade das podridões por tratamento logo após a retirada dos frutos dos armazenamentos aos quais foram submetidos. Pode-se dar destaque ao tratamento térmico adicionado com bicarbonato de sódio que além de apresentar menor quantidade de frutos com podridões, as podridões apresentavam menores dimensões, ao contrário dos tratamentos com óleos essenciais que além de apresentar a maioria dos frutos com podridões, estas estavam também em estado de desenvolvimento mais avançado.

Figura 4 - Índice de doença dos frutos conforme tratamento após período de armazenamento dos frutos. Linhas sobre cada coluna no gráfico indicam valores de desvio padrão por tratamento.

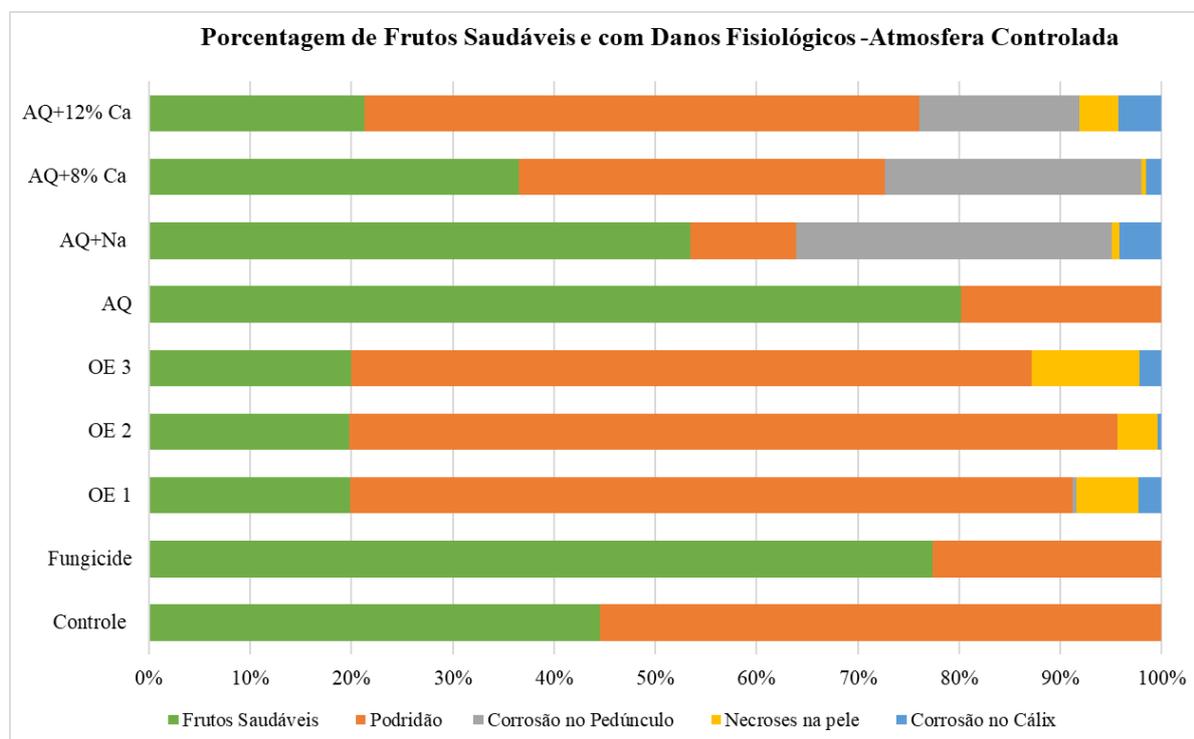


*Letras diferentes indicam diferença estatística significativa segundo o teste Skott Knott ($p < 0,05$).

Abreviações: OE1= Óleo essencial de *C. winterianus*; OE2= Óleo essencial de *C. Citriodora*; OE3= Óleo de *C. Citratus*; AQ= Água Quente; AQ+Na= Água Quente + bicarbonato de sódio; AQ+8%Ca= Água quente + 8% de cloreto de cálcio; AQ+12%Ca= Água quente + 8% de cloreto de cálcio. Fonte: autoria própria.

Os frutos submetidos aos tratamentos água quente e fungicida apresentaram os maiores percentuais de frutos sadios (Figura 5), apresentando baixa ou nenhuma outra desordem fisiológica. Maçãs tratadas com o tratamento água quente mais adição de cloreto de cálcio e o tratamento água quente mais bicarbonato de sódio apresentaram as maiores incidências de frutos com desordens fisiológicas na superfície da epiderme, principalmente na região do pedúnculo (Figura 6A e B) e do cálix (Figura 7) dos frutos, como necroses. Além do mais, frutos tratados com cloreto de cálcio apresentaram resíduos pulverulento branco sobre a pele das maçãs (Figura 6A).

Figura 5 - Porcentagem de frutos saudáveis, podridões e demais desordens fisiológicas externas em maçãs `Topaz` submetidas em armazenamento em atmosfera controlada e após sete dias de prateleira em ambiente com temperatura de 20°C.



Observação: Frutos com podridões poderiam também apresentar demais desordens fisiológicas.

Abreviações: OE1= Óleo essencial de *C. winterianus*; OE2= Óleo essencial de *C. Citriodora*; OE3= Óleo de *C. Citratus*; AQ= Água Quente; AQ+Na= Água Quente + bicarbonato de sódio; AQ+8%Ca= Água quente + 8% de cloreto de cálcio; AQ+12%Ca= Água quente + 8% de cloreto de cálcio. Fonte: autoria própria.

Figura 6- Frutas com massa pulverulenta branca (resíduos do tratamento com cálcio nos frutos) (A) e corrosão no pedúnculo dos frutos causados pelos tratamentos com adição de cloreto de cálcio (B).



Fonte: autoria própria.

Figura 7 - Frutas com corrosão na região do pedúnculo e do cálice em tratamentos com bicarbonato de sódio.



Fonte: autoria própria.

Maçãs tratadas com os óleos essenciais apresentaram evidente fitotoxicidade pelo produto e/ou modo de aplicação, o que resultou em intensa necrose na superfície dos frutos e corrosão especialmente na região do cálix (Figura 8B), sendo tal condição o que estimulou a significativa incidência de podridão nos frutos (Figura 8A).

Os frutos submetidos em tratamento com fungicida apresentaram resíduo do princípio ativo Pyrimethanil, após sete dias de prateleira, de 1,4 e 1,3 mg.kg^{-1} , nas condições de armazenamento RA e CA, respectivamente (Tabela 3). A concentração do princípio ativo encontrada nos frutos está abaixo da máxima concentração permitida do PA por kg de fruta, que de acordo com o Regulamento (CE) nº 396/2005 do Parlamento Europeu e do Conselho é de 15 mg.kg^{-1} . Com as análises da concentração da solução de aplicação, pode-se saber exatamente a concentração inicial (270 mg.kg^{-1}) e final (260 mg.kg^{-1}) do princípio ativo no momento da aplicação do tratamento fungicida nos frutos e ainda verificar, se a neutralização -

realizada para proceder com o correto descarte do produto, foi efetuada com sucesso, o que se confirma com os resultados apresentados, tendo em vista que a concentração do princípio ativo após a neutralização foi de apenas $0,11 \text{ mg.kg}^{-1}$.

Figura 8- Podridão intensa em tratamento com maçãs 'Topaz' (A) causada pela aplicação de óleo essencial por método de imersão e região do cálix dos frutos com fitotoxicidade (B).



Fonte: autoria própria.

Tabela 3 - Resultados das análises de resíduos dos frutos tratados com fungicida Pembotec[®] (P.A. Pyrimethanil) e da solução em que os frutos foram tratados, em três diferentes momentos: início da aplicação, após aplicação e após neutralização da solução.

Tratamento	Resíduo do Princípio Ativo Pyrimethanil (mg.kg^{-1})	
	RA	CA
Controle	0,0	0,0
Fungicida	1,4	1,3
Máxima concentração permitida nos frutos: 15 mg.kg^{-1}		

Momento Análise	Concentração da Solução de Aplicação (mg.kg^{-1})
Início Aplicação	270
Final Aplicação	260
Após Neutralização	0,11

Fonte: autoria própria.

5.4 DISCUSSÃO

Os frutos mantiveram maior qualidade nos tratamentos conservados em atmosfera controlada, o que é explicado por Brackmann et al. (2005) pelo fato do armazenamento em atmosfera controlada diminuir a atividade respiratória dos frutos, promovido pelo controle das pressões parciais de O₂ e CO₂ dentro das câmaras combinado com baixas temperaturas e elevada umidade.

Os resultados do presente estudo com tratamento térmico estão de acordo com trabalhos anteriores que também relataram uma diminuição efetiva de podridões durante o período de armazenamento de maçãs (NEUWALD; KITTEMANN, 2016; WASSERMANN et al., 2019; SCHLOFFER; LINHARD, 2016). Tahir et al. (2009) também observaram no tratamento térmico em combinação com atmosfera controlada menor incidência de podridões e nenhum efeito negativo na qualidade de maçãs, sendo mantida a firmeza da polpa dos frutos.

Em estudo por Maxin et al. (2012) com maçãs ‘Elstar’ com tratamento térmico em diferentes temperaturas a fim de observar os efeitos nos frutos e nos patógenos infestantes, foi observado que acima de 52 °C e pelo período de tempo de três minutos, danos severos por escaldaduras na superfície dos frutos foram gerados, o que levou a aumentar as podridões por *Neonectria galligena* e *Penicillium expansum*, enquanto efeito inibidor direto no patógeno *P. expansum*, somente foi analisado a temperatura de 70 °C em tratamento com frutos pré-inoculados, porém a esta temperatura o tecido vegetal também foi danificado.

Em maçãs das cultivares ‘Braeburn’ e ‘Green Star’, Kabelitz et al. (2019) estudaram a transferência de calor do tratamento térmico por água quente nas diferentes camadas dos frutos, onde foi observado que o principal efeito da descontaminação dos frutos por microrganismos na temperatura de 55 °C pelo tempo de 0,5 minutos, certamente não seja devido a um efeito direto do calor sobre os patógenos aderidos à superfície e sim a um efeito sinérgico de diferentes fatores, a exemplo também de uma melhor lavagem dos microrganismos da superfície do fruto, tendo em vista que a temperatura na superfície dos frutos não excedeu 35 °C e apenas excedeu para pouco mais de 40°C quando o período de tempo foi aumentado para 2 minutos.

Maxin et al. (2012) concluíram que o principal efeito do tratamento com água quente contra podridões é mediado pela resistência adquirida da fruta, induzida pelo calor, e não pela mortalidade dos esporos devido a temperatura. Proteínas expressadas pelo tratamento térmico e que induzem a resistência nos frutos são destacadas por Pavoncello et al. (2001), os quais relatam dois principais grupos de proteínas, as proteínas de choque térmico (HSPs) e as proteínas de patogênese relacionada (PRPs). Quitinases e $\beta^{-1,3}$ -glucanase são exemplos de

proteínas de patogênese relacionada (PRPs) expressadas no tecido dos frutos através do tratamento térmico (PAVONCELLO et al., 2001; SCHIRRA et al., 2000).

Mudanças na estrutura epicuticular da cera em maçãs foram também observadas por Tahir et al. (2009), resultando em maior resistência a infecções patogênicas, tendo em vista que pequenas fissuras podem ser preenchidas pela cera derretida, assim como estruturas patogênicas podem ser revestidas, prevenindo a inoculação.

O conteúdo de cálcio nos tratamentos com aplicação de cloreto de cálcio (8 e 12%) em ambiente refrigerado possuíram correlação positiva com a firmeza de polpa ($r = 0,92$). Resultados semelhantes foram observados por Hussain et al. (2012) em que a manutenção da firmeza de polpa foi observada após o tratamento com cloreto de cálcio. Dukani et al. (2018), relatam que o aumento do conteúdo de cálcio nos frutos fortalece as estruturas das paredes celulares, interagindo com ácidos pécicos na parede da célula para formar pectato de cálcio, fortalecendo a parede celular e inibindo sua degradação. Kitemann et al. (2010) também observaram que o tratamento com cálcio diminuiu o amolecimento das frutas, da respiração e da produção de etileno.

Com tratamento em forma de spray com 1% de Ca na pré-colheita e tratamento térmico com água quente na pós-colheita (42 °C por 2 h), Sharma et al. (2013) relatam também manutenção da firmeza de polpa e dos atributos de qualidade dos frutos, assim como diminuição de podridão no armazenamento, o que vai de encontro com resultados encontrados neste estudo, com exceção do tratamento água quente e adição de cloreto de cálcio (12%) em atmosfera controlada, o qual não diferiu do tratamento controle na mesma condição de armazenamento. Tratamentos com a diminuição da concentração de cloreto de cálcio e de bicarbonato de sódio ou ainda a associação destes dois sais, podem ser tema de trabalhos futuros e trazer resultados interessantes.

Apesar do tratamento térmico com água quente e adição de bicarbonato de sódio reduzir em grande proporção a incidência de podridões, desordens fisiológicas observadas na superfície dos frutos e aspecto de murcha fazem com que o tratamento perca alguma viabilidade. Plaza et al., (2004) também relatam a diminuição de podridões quando aliado tratamento térmico e adição de carbonato de sódio, no entanto em citrus onde foi avaliado podridões do gênero *Penicillium* sp. Youssef et al., (2014) utilizaram tratamento com carbonato e bicarbonato de sódio para induzir mecanismos de defesa contra podridão em frutos cítricos.

Diferentes métodos de aplicação de óleos essenciais em frutos são citados na literatura, para estudo de controle de podridões pós colheita, como fumigação, aspersão, volatilização (NERI et al., 2006; TAŞ; KARACA, 2015; YASSIR et al., 2015), no entanto deve-se estar

também atento as concentrações, as quais podem gerar a efeitos fitotóxicos nos frutos, o que altera a eficiência do controle (SANTORO et al., 2018). No atual trabalho constatou-se que as concentrações e/ ou a forma de aplicação dos óleos essenciais foram as responsáveis pela alta fitotoxicidade apresentada nos frutos, necessitando desta forma realizar outros estudos com menores doses e/ou modificações na metodologia de aplicação.

5.5 CONCLUSÃO

Os tratamentos térmicos com água quente e o tratamento com fungicida Pembotec® promoveram os maiores percentuais de frutos saudáveis para a cultivar ‘Topaz’ oriunda a partir de sistema de produção orgânica.

Os frutos mantêm-se com melhor qualidade quando submetidos em armazenamento em atmosfera controlada.

Trabalhos futuros com diminuição das concentrações de sais de cálcio e sódio, ou até mesmo associação destes dois são sugeridos, assim como trabalhos com concentrações menores de óleo essencial e modificações na forma de aplicação poderiam trazer resultados interessantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Brackmann, A.; Giehl, R. F. H.; Antes, R. B.; Neuwald, D. A.; Sestari, I. & Pinto, J. A. V. (2005). Condições de atmosfera controlada para o armazenamento de maçãs 'Royal Gala' de diferentes tamanhos. *Ciência Rural*, 35(5), 1049-1053.

Dukani, H. A. I.; Kasnazany, S. A. S.; Kakahy, A. N. N. (2018) Effect of Rosemary Plant Extract and Calcium Chloride Sprays on the Some Fruit Quality and Storability of Strawberry (*Fragaria X Ananassa Duch*) Grown under Plastic House Conditions. *Euphrates Journal of Agriculture Science-01* (3): 32- 48

Grantina-Ievina, L. (2015). Fungi Causing Storage Rot of Apple Fruit in Integrated Pest Management System and their Sensitivity to Fungicides. *Rural Sustainability Research*, 34(329), 2–11. doi:10.1515/plua-2015-0007

Hussain, P.R., Meena, R.S., Dar, M.A., Wani, A.M., 2012. Effect of post-harvest calcium chloride dip treatment and gamma irradiation on storage quality and shelf-life extension of Red delicious apple. *Journal of Food Science and Technology* 49, 415-426. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0289-0>

Kabelitz, T., & Hassenberg, K. (2018). *Control of apple surface microflora for fresh-cut produce by post-harvest hot-water treatment. LWT.* doi:10.1016/j.lwt.2018.08.062

Kabelitz, T., Schmidt, B., Herppich, W. B., & Hassenberg, K. (2019). *Effects of hot water dipping on apple heat transfer and post-harvest fruit quality. LWT.* doi:10.1016/j.lwt.2019.03.067

Kittermann, D., Neuwald, D. A., & Streif, J. (2010). Influence of calcium on fruit firmness and cell wall degrading enzyme activity in “Elstar” apples during storage. *Acta Horticulturae*, (877), 1037–1043. doi:10.17660/actahortic.2010.877.140

Luna-Gutzman, M. Cantwell, D.M. Barrett. (1999) Fresh-cut cantaloupe: effects of CaCl₂ dips and heat treatments on firmness and metabolic activity. *Postharvest Biol. Technol.*, 17, pp. 201-213

Mari, Marta & Bautista-Baños, Silvia & Sivakumar, Dharini. (2016). Decay control in the postharvest system: Role of microbial and plant volatile organic compounds. *Postharvest Biology and Technology*. 122. 10.1016/j.postharvbio.2016.04.014.

Maxin, P., Weber, R.W.S., Pedersen, H.L., Williams, M., 2012. Hot-water dipping of apples to control *Penicillium expansum*, *Neonectria galligena* and *Botrytis cinerea*: effects of temperature on spore germination and fruit rots. *European Journal of Horticultural Science* 77, 1-9.

Nazzaro, F., Fratianni, F., Coppola, R., & Feo, V. (2017). Essential Oils and Antifungal Activity. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 10(4), 86. <https://doi.org/10.3390/ph10040086>

Neri, F., Mari, M. and Brigati, S. (2006), Control of *Penicillium expansum* by plant volatile compounds. *Plant Pathology*, 55: 100–105. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2005.01312.x>

Neuwald, D.A., Kittermann, D., 2016. Influence of hot water dipping on the fruit quality of organic produced ‘Topaz’ apples. *Acta Horticulturae* 1144, 355-358. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2016.1144.52>

Pavoncello, D., Lurie, S., Droby, S., & Porat, R. (2001). *A hot water treatment induces resistance to Penicillium digitatum and promotes the accumulation of heat shock and pathogenesis-related proteins in grapefruit flavedo. Physiologia Plantarum*, 111(1), 17–22. doi:10.1034/j.1399-3054.2001.1110103.x

Plaza, P., Usall, J., Torres, R., Abadías, M., Smilanick, J. L., & Viñas, I. (2004). *The use of sodium carbonate to improve curing treatments against green and blue moulds on citrus fruits. Pest Management Science*, 60(8), 815–821. doi:10.1002/ps.880

Poovaliah, B. W. 1986. Role of Calcium in Prolonging Storage life of fruits and vegetables. *Food Technology*, May 1989. 86-89.

Rienth M, Crovadore J, Ghaffari S, Lefort F (2019) Oregano essential oil vapour prevents *Plasmopara viticola* infection in grapevine (*Vitis Vinifera*) and primes plant immunity mechanisms. *PLoS ONE* 14(9): e0222854. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222854>

Santoro, Karin; Maghzenani, Marco; Chiabrando, Valentina; Bosio, Pietro; Gullino, Maria L.; Spadaro, Davide; Giacalone, Giovanna. 2018. "Thyme and Savory Essential Oil Vapor

Treatments Control Brown Rot and Improve the Storage Quality of Peaches and Nectarines, but Could Favor Gray Mold" *Foods* 7, no. 1: 7. <https://doi.org/10.3390/foods7010007>

Sharma, R.R., Singh, D., Pal, R.K., 2013. Synergistic influence of pre-harvest calcium sprays and postharvest hot water treatment on fruit firmness, decay, bitter pit incidence and postharvest quality of royal delicious apples (*Malus x domestica* borkh). *American Journal of Plant Sciences* 4, 153–159. <https://doi.org/10.4236/ajps.2013.4102>

Schirra, M., D'hallewin, G., Ben-Yehoshua, S., & Fallik, E. (2000). *Host–pathogen interactions modulated by heat treatment. Postharvest Biology and Technology*, 21(1), 71–85. doi:10.1016/s0925-5214(00)00166-6

Schloffer, K., Linhard, D., 2016. Short time-high temperature hot water shower against *Neofabraea* rot, in: *Ecofruit. 17th International Conference on Organic Fruit-Growing: Proceedings*, 15–17 February 2016 (Fördergemeinschaft Ökologischer Obstbau EV (FÖKO)). FÖKO Hohenheim, Germany, pp. 176–179.

Streif, J., Kitemann, D., Neuwald, D.A., McCormick, R., and Xuan, H. (2010). Pre- and post harvest management of 358 fruit quality, ripening and senescence. *Acta Hort.* 877, 55–68 <http://dx.doi.org/10.17660/ActaHortic.2010.877.2>.

Tahir, I., Dey, E.S. and Nybom, H. (2019). Application of alkylresorcinols in an organic apple orchard for protection against storage diseases. *Eur.J.Hortic.Sci.* 84(3), 142–151. DOI: 10.17660/eJHS.2019/84.3.4

Tahir, I. I., Johansson, E., & Olsson, M. E. (2009). Improvement of Apple Quality and Storability by a Combination of Heat Treatment and Controlled Atmosphere Storage, *HortScience horts*, 44(6), 1648–1654.

Taş, L. & Karaca, G. (2015). Effects of Some Essential Oils on Mycelial Growth of *Penicillium expansum* Link and Blue Mold Severity on Apple. *Asian Journal of Agriculture and Food Sciences*. 3. 643.

Wassermann B, Kusstatscher P and Berg G(2019) Microbiome response to hot water treatment and potential synergy with biological control on stored apples. *Front. Microbiol.* 10:2502. doi:10.3389/fmicb.2019.02502

Yassir, El & Manssouri, M. & Bouyanzer, A. & Majidi, Lhou & Lahhit, N. & Hajar, Bendaif & Costa, Jean & Chetouani, A. & Elmsellem, Hicham & Hammouti, B.. (2015). Essential oil composition and antifungal activity of *Salvia officinalis* originating from North-East Morocco, against postharvest phytopathogenic fungi in apples. *Der Pharma Chemica*, 2015, 7(9):95–102

Youssef, K., Sanzani, S. M., Ligorio, A., Ippolito, A., & Terry, L. A. (2014). *Sodium carbonate and bicarbonate treatments induce resistance to postharvest green mould on citrus fruit. Postharvest Biology and Technology*, 87, 61–69. doi:10.1016/j.postharvbio.2013.08.006

6. DISCUSSÃO GERAL

A ação antifúngica dos óleos essenciais fica evidente nos trabalhos desenvolvidos *in vitro*, sendo a ação da atividade biológica dos óleos essenciais dependentes da sua composição química. Óleos essenciais que apresentam compostos majoritários com atividade antifúngica, apresentam maior eficiência no controle de fungos, necessitando de menores doses.

O potencial dos óleos essenciais no controle de fitopatógenos, como discutido nos capítulos anteriores deste trabalho é atribuído não somente por efeito fungitóxico direto, sob o patógeno, como também pode estar associado a indução de diferentes mecanismos de resistência, o que seria explicado pelo seu caráter elicitor.

No entanto, quando associado os óleos essenciais com os frutos, interações complexas e modificações dos patossistemas fazem com que resultados tornam-se diferentes dos observados na fase anterior, e por vezes fazendo com que a podridão fosse aumentada ao invés de controlada, como uma consequência secundária de áreas necrosadas dos frutos, geradas por fitotoxidez, servindo de uma porta de entrada para a infecção e colonização de patógenos causadores de podridões, o que pode ser nitidamente observado no decorrer do último trabalho.

As características lipofílicas dos óleos essenciais, as quais explicam sua insolubilidade em solvente aquoso, dificultam a aplicabilidade destes de forma homogênea nos produtos vegetais, evidenciando a necessidade de futuros trabalhos para o desenvolvimento de metodologias adequadas de aplicação, ajustes de concentrações e ainda micro encapsulação dos compostos, levando em consideração as características voláteis dos compostos essenciais.

Referente aos tratamentos realizados com maçãs 'Topaz', estes evidenciam a importância do armazenamento em atmosfera controlada como ferramenta no prolongamento da conservação de frutos, obtido pela redução da atividade metabólica por meio do controle da combinação entre baixa pressão parcial de gás oxigênio (O_2) e incremento da pressão parcial de gás carbônico (CO_2), baixa temperatura e alta umidade relativa.

Além do mais, os tratamentos térmicos e tratamento com fungicida Pyrimethanil trazem resultados interessantes no controle das podridões e manutenção da qualidade dos frutos, sendo ferramentas adicionais para os produtores a fim de minimizar as perdas. Os efeitos indiretos do tratamento térmico sob o controle das podridões são discutidos nos trabalhos, e evidenciam um efeito sinérgico de fatores geradores do controle, como sanitização do produto por água quente, efeito direto sobre o patógeno, alterações nas camadas de cera e ainda, como um dos mais relevantes, a indução de genes de defesas nos frutos a partir da indução térmica.

Interessantes resultados das análises de resíduos dos frutos submetidos ao tratamento com o fungicida Pyrimethanil destacam que o produto pode ser aplicado com segurança nos

frutos, tendo em vista as baixíssimas concentrações de resíduos ainda encontrado após os períodos de armazenamento, significativamente abaixo da máxima concentração de resíduo permitida pelas autoridades competentes.

7. CONCLUSÃO GERAL

Os óleos essenciais apresentaram eficiente controle dos patógenos *Rhizopus oryzae* e *Penicillium expansum* na condição *in vitro*, no entanto, os resultados *in vivo* não apresentaram a mesma sincronia que os resultados obtidos na fase *in vitro*, não controlando o desenvolvimento de podridões nos frutos, com exceção do óleo essencial de *C. martinii* em maçãs, que apresentou menor severidade de podridão bolor azul (*Penicillium expansum*) comparada ao tratamento controle. Óleos essenciais foram aplicados também no tratamento com maçãs de produção orgânica na Alemanha e houve manifestação de fitotoxicidade nos frutos nas doses aplicadas, desta forma ao invés de proporcionar um efeito benéfico aumentaram a perda de qualidade e a ocorrência de podridões.

Maçãs conservadas em atmosfera controlada apresentaram-se com maior qualidade, destacando-se os tratamentos térmico com água quente e o tratamento fungicida como os mais promissores, os quais apresentaram menores incidência de podridões, mantiveram a qualidade dos frutos e apresentaram a maior proporção de frutos saudáveis, podendo ser recomendados para o armazenamento de maçãs ‘Topaz’.

Trabalhos futuros com ajustes nas concentrações de Ca, Na e dos óleos essenciais seriam interessantes, bem como a forma de aplicação para este último, tendo em vista os danos gerados por fitotoxicidade, visíveis já algumas horas após a aplicação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHARONI, Y., FALLIK, E., COPEL, A., GIL, M., GRINBERG, S., & KLEIN, J. D.. **Sodium bicarbonate reduces postharvest decay development on melons.** *Postharvest Biology and Technology*, 10(3), 201–206, 1997.

ANARUMA, N. D. et al. **Control of *Colletotrichum gloeosporioides* (penz.) Sacc. In yellow passion fruit using *Cymbopogon citratus* essential oil.** *Brazilian Journal of Microbiology*, (2010), 41(1), 66-73.

ANUÁRIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 2018. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta, 2018. 92 p.

ASIF, M. H., PATHAK, N., SOLOMOS, T., & TRIVEDI, P. K. (2009). **Effect of low oxygen, temperature and 1-methylcyclopropene on the expression of genes regulating ethylene biosynthesis and perception during ripening in apple.** *South African Journal of Botany*, 75(1), 137–144, 2009.

AUINGER, A., TRIERWEILER, B., LÜCKE, F. K., & TAUSCHER, B. **Influence of hot water treatment on different quality parameters of apples during storage.** *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 79, 154–156. 2005.

BARALDI E. et al. **Studies on thiabendazole resistance of *Penicillium expansum* of pears: pathogenic fitness and genetic characterization.** *Plant Pathology* , 2003, 52: 362–70.

BAUTISTA-BAÑOS, S.; GARCÍA-DOMÍNGUEZ, E.; BARRERA-NECHA, L. L.; REYES-CHILPA, R.; WILSON, C. L. **Seasonal evaluation of the postharvest fungicidal activity of powders and extracts of huamuchil (*Pithecellobium dulce*): action against *Botrytis cinerea*, *Penicillium digitatum* and *Rhizopus stolonifer* of strawberry fruit.** *Postharvest Biology and Technology*, 29(1), 81–92. 2003. doi:10.1016/s0925-5214(02)00244-2

BEDENDO, I. P. **Podridões de órgãos de reserva.** *In:* Amorim, L.; Rezende, J. A. M.; Bergamin Filho, A. *Manual de Fitopatologia, Vol. I, Princípios e Conceitos, 5ª Ed.* Ouro Fino – MG: Agronômica Ceres, 2018. p. 317 – 321.

BELDING, R. D.; BLANKENSHIP, S. M.; YOUNG, E.; LEIDY, R. B. **Composition and variability of epicuticular waxes in apple cultivars.** J. Amer. Soc. Hort. Sci 123: 348-256. 1998.

BRACKMANN, A.; PAVANELLO, E. P.; BOTH, V.; JANISCH, D. I.; SCHMITT, O. J.; G., G. **Avaliação de genótipos de morangueiro quanto à qualidade e potencial de armazenamento.** *Revista Ceres*, 2011. 58(5), 542-547.

BRIZZOLARA, S.; MANGANARIS, G. A.; FOTOPOULOS, V.; WATKINS, C. B.; TONUTTI, P. **Primary metabolism in fresh fruits during storage.** *Frontiers in Plant Science*, v. 11, 2020.

BUSATTO, N.; TADIELLO, A.; TRAINOTTI, L.; COSTA, F. Climacteric ripening of apple fruit is regulated by transcriptional circuits stimulated by cross-talks between ethylene and auxin. *Plant signaling & behavior*, 12(1). 2017.
<https://doi.org/10.1080/15592324.2016.1268312>

CASTRO, H. G. et al. **Contribuição ao estudo das plantas medicinais – Metabólitos secundários.** 2. Ed.- Visconde do Rio Branco: [s.n.], 2004. 113 p.

CONWAY, W. S.; JANISIEWICZ, W. J.; KLEIN, J. D.; SAMS, C. E. **Strategy for Combining Heat Treatment, Calcium Infiltration, and Biological Control to Reduce Postharvest Decay of 'Gala' Apples,** *HortScience HortSci*, 34(4), 700-704. 1999.

D'AGOSTINO, M. et al. **Essential Oils and Their Natural Active Compounds Presenting Antifungal Properties.** *Molecules (Basel, Switzerland)*, (2019). 24(20), 3713.

DHIFI, W. et al. **Essential Oils' Chemical Characterization and Investigation of Some Biological Activities: A Critical Review.** *Medicines (Basel, Switzerland)*, (2016), 3(4), 25.
<https://doi.org/10.3390/medicines3040025>

DONATI, I. **Enzimi, acidi organici ed altri metaboliti coinvolti nella patogenesi di *Penicillium spp.*** Università di Bologna. 2008

FERREIRA NETO, J. et al. **Avaliação das câmaras frias usadas para o armazenamento de frutas e hortaliças no entreposto terminal de São Paulo (CEAGESP):** CEAGESP. Engenharia Agrícola. V. 26, n. 3, 2006.

FRANCO, M. J. C. S.; ALBIERO, A. L. M. **Estruturas secretoras em folha e caule de *Esenbeckia febrifuga* (A.St.-Hil.) A. Juss. ex Mart. e *Esenbeckia grandiflora* Mart. (Rutaceae).** Hoehnea, São Paulo, v. 45, n. 3, p. 468-483, set. 2018.

FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. **Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins.** (2004). Studies in Mycology 49: 1-174.

FELIPE, L. O.; BICAS, J. L. **Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais.** Química e Sociedade. São Paulo, SP. 2017, V. 39, n. 2, p. 120-30.

GALVAO, J. G. et al. **Uso do fungo *Fusarium oxysporum* como indicador de ametrina, através da medida de biomassa, pela quantificação do ergosterol.** *Ciênc. agrotec.* [online]. 2003, vol.27, n.4

GIRARDI; C. L.; SANHUEZA, R. M. V.; BENDER; R. J. **Manejo Pós-colheita e Rastreabilidade na Produção Integrada de Maca.** Circular técnica 31, Embrapa. Bento Gonçalves, RS, junho, 2002.

GONÇALVES, A. H. et al. **Atividade fungitóxica *in vitro* dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* Cham., *Cymbopogon citratus*(D.C.) Stapf. e de seus constituintes majoritários no controle de *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii*.** Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, 2015, 17(4, Suppl. 3), 1007-1015.

GUAN, W., & FAN, X. **Combination of Sodium Chlorite and Calcium Propionate Reduces Enzymatic Browning and Microbial Population of Fresh-Cut “Granny Smith” Apples.** Journal of Food Science, 2010, 75(2), M72–M77. doi:10.1111/j.1750-3841.2009.01470.x

Grantina-Ievina, L. Fungi Causing Storage Rot of Apple Fruit in Integrated Pest Management System and their Sensitivity to Fungicides. *Rural Sustainability Research*. 34. 10.1515/plua-2015-0007.

HUDAIB M.; ABURJAI, T. **Volatile components of *Thymus vulgaris* L. from wild-growing and cultivated plants in Jordan**. *Flavour and Fragrance Journal*. 2007; V. 22, n.4, p. 322–327.

JAN, I.; RAB, A.; SAJID, M.; IQBAL, A.; SHINWARI, Z.; HAMAYUN, M. **Effect of calcium salt on soft rot, bitter pit and physicochemical properties of stored apples**. *Pakistan Journal of Botany*. 48. 1415-1420, 2016

JAMIOŁKOWSKA, A. **Natural Compounds as Elicitors of Plant Resistance Against Diseases and New Biocontrol Strategies**. *Agronomy* 2020, 10, 173.

JANAKA, M. A. S.; BETTI, J. A.; KIMATI, H. **Doenças do Morangueiro**. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, I. E. A. *Manual de Fitopatologia*. Vol. II: Doenças das Plantas Cultivadas, 4^a Ed. Editora Agronômica Ceres Ltda. São Paulo – SP, 1997, p.516-529.

JANISIEWICZ, W.; KORSTEN, L. **Biological control of postharvest diseases of fruits**. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 40 (2002), pp. 411-441

KABELITZ, T., HASSENBERG, K., **Control of apple surface microflora for fresh-cut produce by post-harvest hot-water treatment**, *LWT - Food Science and Technology* (2018), doi: 10.1016/j.lwt.2018.08.062.

KABELITZ, T.; SCHMIDT, B.; HERPPICH, W. B.; HASSENBERG, K. **Effects of hot water dipping on apple heat transfer and post-harvest fruit quality**. *Food Science and Technology -LWT*. V. 108, July 2019, Pg 416-420.

KALAGATUR, N. K. et al. **Antifungal Activity of Chitosan Nanoparticles Encapsulated With *Cymbopogon martinii* Essential Oil on Plant Pathogenic Fungi *Fusarium graminearum***. *Frontiers in pharmacology*, 2018, 9, 610. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00610>

KITTEMANN, D.; NEUWALD, D. A.; STREIF, J. **Influence of calcium on fruit firmness and cell wall degrading enzyme activity in “Elstar” apples during storage.** *Acta Horticulturae*, (877), 2010, 1037–1043. doi:10.17660/actahortic.2010.877.140

KHOKHAR, I., JIA, Y., MUKHTAR, I., WANG, J.H., RUTH, N., ELTOUKHY, A., FAN, S.H., LI, X.J., WANG, J.Y., AND YAN, Y.C. **First report of *Rhizopus oryzae* causing postharvest fruit rot on pear in China.** *Pl. Dis.* 2019, 103(6): 1423. (a)

KHOKHAR, I., MUKHTAR, I., WANG, J., JIA, Y., YAN, Y. **A report of *Rhizopus oryzae* causing postharvest soft rot of apple fruit in China.** *Australasian Plant Disease Notes*, 2019, 14: 7. (b)

KLEIN, J. D.; CONWAY, W. S.; WHITAKER, B. D.; SAMS, C. E. (1997). **Botrytis cinerea Decay in Apples Is Inhibited by Postharvest Heat and Calcium Treatments**, *Journal of the American Society for Horticultural Science* 122(1), 91-94, 1997.

KRZYŚKO-ŁUPICKA, T.; SOKÓŁ, S.; & PIEKARSKA-STACHOWIAK, A. A. **Evaluation of Fungistatic Activity of Eight Selected Essential Oils on Four Heterogeneous *Fusarium* Isolates Obtained from Cereal Grains in Southern Poland.** *Molecules (Basel, Switzerland)*, 2020, 25(2), 292.

KWON, J.-H., HA, J.-S., AND KIM, J. **Postharvest soft rot on *Citrullus vulgaris* caused by *Rhizopus oryzae* in South Korea.** *Australasian Plant Disease Notes*, 2014. 9: 129. (a)

KWON, J. H.; KANG, D. W.; YOON, H. S.; KWAK, Y. S.; KIM, J. H. **Rhizopus Fruit Rot Caused by *Rhizopus oryzae* on Strawberry.** *Journal of Agriculture & Life Science*, 2014. 48. 27-34. 10.14397/jals.2014.48.4.27. (b)

KWON, J.-H., RYU, J.-S., CHI, T.T.P., SHEN, S.-S., AND CHOI, O. **Soft rot of *Rhizopus oryzae* as a postharvest pathogen of banana fruit in Korea.** *Mycobiology*, 2012. 40(3): 214-216.

LACCHIA, A. P. S.; GUERREIRO, S. M. C. **Aspectos ultra-estruturais dos canais secretores em órgãos vegetativos e reprodutivos de Anacardiaceae.** *Acta Bot. Bras.*, São Paulo, v. 23, n. 2, p. 376-388, June 2009.

LAMBERT, R.J. et al. **A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol.** *J Appl Microbiol.* 2001;91(3):453-462.

LUNARDI, R. et al. . **Tratamento por água quente na qualidade de maçãs 'fuji', inoculadas artificialmente com *Botryosphaeria dothidea*, em armazenamento refrigerado.** Cienc. Rural, Santa Maria , v. 32, n. 4, p. 565-570, Aug. 2002 .

MAROTTI, M. et al. **Agronomic and chemical evaluation of three varieties of *Foeniculum vulgare* Mill.** Presented at First World Congress on Medicinal and Aromatic Plants for Human Welfare. Maastricht, The Netherlands, 1992. pp. 19–25.

MAXIN, P.; WEBER, R.W.S.; LINDHARD PEDERSEN, H.; WILLIAMS, M. **Hot-Water Dipping of Apples to Control *Penicillium expansum*, *Neonectria galligena* and *Botrytis cinerea*: Effects of Temperature on Spore Germination and Fruit.** Europ.J.Hort.Sci., 77 (1). S. 1–9, 2012

MAZARO, S. M. **Indução de resistência à doenças em morangueiro pelo uso de elicitores.** Tese (Doutorado) apresentada ao Programa de Pos-graduação em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal. Curitiba, 2007.

MENDES, L.D. et al. **Avaliação in vitro da ação da quitosana e de seu derivado quaternizado na inibição do crescimento do fungo *Penicillium expansum*.** Revista Brasileira de Engenharia de Biosistemas, v.10, n.1, p.116-128, 2016.

MUSACCHI, S.; SERRA, S. Apple fruit quality: Overview on pre-harvest factors. Scientia Horticulturae, Amsterdam, v. 234, p. 409-430, 2018.

NATALE, W.; PRADO, R. M.; MÔRO, F. V. **Alterações anatômicas induzidas pelo cálcio na parede celular de frutos de goiabeira.** Pesquisa Agropecuária Brasileira. V. 40, n. 12, 2005.

NEGRINI, M. et al. **Insecticidal activity of essential oils in controlling fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*.** *Arquivos do Instituto Biológico*, 86, e1112018. Epub July 29, 2019.

NEUWALD, D.A., KITTEMANN, D. **Influence of hot water dipping on the fruit quality of organic produced 'Topaz' apples.** Acta Horticulturae 1144, 355-358. 2016. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2016.1144.52>

PANASENKO V.T. **Ecology of microfungi**. Bot. Rev, 1967, 33: 189-215

PARISI, M.C.M. et al. **Doenças Pós-Colheita: Um entrave na comercialização**. Revista Pesquisa e Tecnologia, v12, n.2, Jul-Dez 2015.

PASSAGLIA, V. **Óleos essenciais no controle de *Rhizopus stolonifer* e *Botrytis cinerea* em morangos** / Vanessa Passaglia. Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2017. 49 p.

RIENTH, M. et al. **Oregano essential oil vapour prevents *Plasmopara viticola* infection in grapevine (*Vitis vinifera*) and primes plant immunity mechanisms**. *PLoS One*. 2019;14(9).

ROCHA, A. B. O. **Principais métodos físicos de controle de doenças pós-colheita em frutas e hortaliças**. Revista Nucleus, Ituverava, SP, v.11, n.1, p. 107-114, Abr.2014.

ROCHA NETO, A.C.; DI PIERO, R.M. **Controle do bolor azul em frutos de maçã imersos em solução de ácido salicílico**. Bioscience Journal, v.29(4), p.884-891, 2013.

RODRIGUEZ-GARCIA, I. et al. **Oregano (*Lippia graveolens*) essential oil added within pectin edible coatings prevents fungal decay and increases the antioxidant capacity of treated tomatoes**. J. Sci. Food Agric. 96: 3772-3778, 2016.

SAMS, C. E.; CONWAY, S. W.; ABBOTT, J. A.; LEWIS, R. J.; BENSALON, N. **Firmness and decay of apples following post-harvest pressure infiltration of calcium and heat treatment**. *J Am Soc Hortic Sci*. 1993;118:623-627

SCHIRRA, M., D’HALLEWIN, G., BEN-YEHOSHUA, S., & FALLIK, E. **Host-pathogen interactions modulated by heat treatment**. *Postharvest Biology and Technology*, 2000. 21(1), 71-85.

SENHOR, R. F. et al. **Manejo de doenças pós-colheita**. Revista Verde, v. 4, n. 1, p. 00-13, 2009.

SERAFANI, L. A. et al. **Extração de óleos essenciais de plantas aromáticas e medicinais/** Org. Luciana Atti Serafini et al. – Caxias do Sul: EDUCS, 2002. 55 p.

SHAO, X.; WANG, H.; XU, F.; CHENG, S. **Effects and possible mechanisms of tea tree oil vapor treatment on the main disease in postharvest strawberry fruit.** *Postharvest Biology And Technology*, Amsterdam, v. 77, p.94-101, mar. 2013.

SHREAZ, S. **Impaired ergosterol biosynthesis mediated fungicidal activity of Co(II) complex with ligand derived from cinnamaldehyde.** *Chemico-biological interactions*, 2016, 247, 64–74.

SIMÕES, C.M.O.; SPITZER, V. **Óleos voláteis.** In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento.* 6.ed. Porto Alegre: UFRGS, 2006, p. 467-496.

SINGH, A.; DWIVEDI, P. **Methyl-jasmonate and salicylic acid as potent elicitors for secondary metabolite production in medicinal plants: A review.** *J. Pharmacogn. Phytochem*, [S.L.], v.7, n.1, p.750-757, 2018.

SIQUEIRA, H. H. de et al . **Armazenamento de morango sob atmosfera modificada e refrigeração.** *Ciênc. agrotec.*, Lavras , (2009) v. 33, n. spe, p. 1712-1715.

SOYLU, E.M.; KURT, S.; SOYLU, S. **In vitro and in vivo antifungal activities of the essential oils of various plants against tomato grey mould disease agent Botrytis cinerea.** *Int J Food Microbiol.* 2010;143(3):183⁻189.

TANNOUS, J. et al. **Secondary metabolism in *Penicillium expansum*: Emphasis on recent advances in patulin research.** *Critical reviews in food science and nutrition.* 2018, 58(12), 2082–2098.

Thompson, A. K. *Controlled atmosphere storage of fruits and vegetables/* A. Keith Thompson. – 271 p. 2nd ed. 2010.

TERAO, D.; BATISTA, D. C.; BARBOSA, M. A. G.; **Doenças em pós-colheita de manga.** *In: Circular Técnica online 105* – Embrapa, Petrolina-PE. 2013. 8 pg.

TIRYAKI, O. **Combination of irradiation and sodium carbonate to control postharvest *Penicillium* decay of apples.** The Journal of Turkish Phytopath. 2014, 42. 47-56.

UYAR, G.; BRU, Ö.; UYAR, B. **Effects of ethanol and ultraviolet-c treatments on inactivation of *Rhizopus oryzae* spores which cause postharvest rot.** Food Science and Technology .2019, 39 (3), 691-695.

VELOSO R. A. et al. **Teor e composição do óleo essencial de quatro acessos e duas cultivares de manjeriço (*Ocimum basilicum* L.).** Revista brasileira de plantas medicinais. 2014.

VENTURA et al. **Patologia pós-colheita: doenças do mamão, banana e abacaxi.** In: Simpósio Brasileiro de Pós-colheita de Frutas, Hortaliças e Flores (2.: 2007: Viçosa, MG) Palestras e resumos / II simpósio brasileiro de pós-colheita de frutas, hortaliças e flores, UFV, Viçosa, MG, 24 a 27 de abril de 2007; editores Maria Aparecida Nogueira Sedyama... [et al.]. – Viçosa, MG, 2007 p. 149 a 166.

VIEIRA, A. M. F. D.; STEFFENS, C. A.; ARGENTA, L. C.; AMARANTE, C. V. T. do; OSTER, A. H.; CASA, R. T.; AMARANTE, A. G. M.; ESPÍNDOLA, B. P. **Essential oils for the postharvest control of blue mold and quality of 'Fuji' apples.** Pesquisa Agropecuária Brasileira, [S.L.], v. 53, n. 5, p. 547-556, maio 2018.

WEBER, A.; BRACKMANN, A.; ANESE, R. DE O.; BOTH, V.; PAVANELLO, E. P. **“Royal Gala” apple quality stored under ultralow oxygen concentration and low temperature conditions.** Pesquisa Agropecuária Brasileira, 46(12), p. 1597–1602, 2011.

WEI, Y.; WEI, Y.; XU, F.; SHAO, X. **The combined effects of tea tree oil and hot air treatment on the quality and sensory characteristics and decay of strawberry.** Postharvest Biology And Technology, Amsterdam, v. 136, p. 139-144, fev. 2018.

YAMAMOTO, E.; FERREIRA, R.; FERNANDES, P.; ALBUQUERQUE, L.; ALVES, E.. **Função do cálcio na degradação da parede celular vegetal.** Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável. V.6, n.2, p. 49 – 55, 2011.

YOUSSEF, K.; LIGORIO, A.; SANZANI, S.M.; NIGRO, F.; IPPOLITO, A. **Control of storage diseases of citrus by pre- and postharvest application of salts.** Postharvest Biol. Technol. 72, 57–63, 2012.

YOUSSEF, K.; SANZANI, S. M.; LIGORIO, A.; IPPOLITO, A.; TERRY, L. A. **Sodium carbonate and bicarbonate treatments induce resistance to postharvest green mould on citrus fruit.** Postharvest Biology and Technology, 87, 61–69, 2014.

ZACCHINO, S. **Estratégia para a descoberta de novos agentes antifúngicos.** In: YUNES, R.A. E CALIXTO, J.B. Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna. Chapecó: Argos. 2001. p. 435-479.

ZHOU D. et al. **Carvacrol and eugenol effectively inhibit *Rhizopus stolonifer* and control postharvest soft rot decay in peaches.** J Appl Microbiol. 2018;124(1):166-178. doi:10.1111/jam.13612