

**AMANDA MARIA FURTADO DREHMER VIEIRA**

**ÓLEOS ESSENCIAIS E SUBSTÂNCIAS ALTERNATIVAS NO MANEJO DE PODRIDÕES PÓS-COLHEITA DE MAÇÃS 'FUJI'**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias do Centro de Ciências Agroveterinárias, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Produção Vegetal.

Orientador: Dr. Cristiano André Steffens

Ficha catalográfica elaborada pelo(a) autor(a), com  
auxílio do programa de geração automática da  
Biblioteca Setorial do CAV/UEDESC

Furtado Drehmer Vieira, Amanda Maria  
Óleos essenciais e substâncias alternativas no  
manejo de podridões pós-colheita de maçãs 'Fuji' /  
Amanda Maria Furtado Drehmer Vieira. Lages - 2016.  
87 p.

Orientador: Cristiano André Steffens  
Tese (Doutorado) - Universidade do Estado de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias,  
Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, Lages,  
2016.

1. Malus domestica Borkh. 2. Penicillium  
expansum Link. 3. Criptoporiopsis perennans (Zeller  
& Childs) Wollenweber. 4. Compostos voláteis. I.  
Steffens, Cristiano Andr?. II. Universidade do  
Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação.  
III. Título.

AMANDA M. F. DREHMER VIEIRA

ÓLEOS ESSENCIAIS E SUBSTÂNCIAS ALTERNATIVAS NO MANEJO DE  
PODRIDÕES PÓS-COLHEITA DE MAÇÃS 'FUJI'

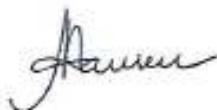
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Produção Vegetal.

Banca examinadora:

Orientador: \_\_\_\_\_



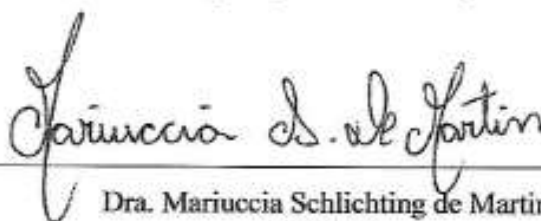
Prof. Dr. Cristiano André Steffens  
Universidade do Estado de Santa Catarina



Membro: \_\_\_\_\_

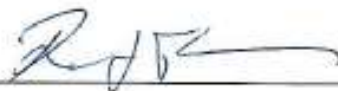
Dra. Andréia Hansen Oster  
Embrapa Agroindústria Tropical

Membro: \_\_\_\_\_



Dra. Mariuccia Schlichting de Martin  
EPAGRI

Membro: \_\_\_\_\_



Prof. Dr. Ricardo Trezzi Casa  
Universidade do Estado de Santa Catarina

Membro: \_\_\_\_\_



Prof. Ph.D. Cassandro Vidal Talamini do Amarante  
Universidade do Estado de Santa Catarina

Lages – SC, 31/08/2016

Ao meu filho, Henrique, minha razão  
de viver.

## AGRADECIMENTOS

A Deus.

Aos meu pais, Germano e Telma, pelo amor, carinho e ensinamentos repassados a mim. Às minhas irmãs, sobrinhas e sobrinho por sempre acreditarem na minha capacidade.

Ao meu marido, Marcelo, meu companheiro, meu amigo, meu amor e colega de trabalho, agradeço as longas conversas e troca de conhecimento. Meu amado filho, Henrique, é por ele que sempre tento ser uma pessoa melhor.

Ao Prof. Cristiano, pela orientação, pela amizade, por acreditar no meu trabalho e sempre me incentivar.

Ao Prof. Cassandro, desde o ano de 1.999, quando comecei a trabalhar no laboratório de pós-colheita, me orientando e contribuindo para minha formação profissional, com paciência e amizade.

Ao Prof. Ricardo, agradeço a paciência em repassar conhecimentos de fitopatologia, com quem muito tenho aprendido, e agradeço por ter disponibilizado o laboratório para as análises de experimentos.

À Dra. Andréia, pela parceria nos trabalhos, sempre disponível a ajudar quando solicito sua orientação e a Embrapa Agroindústria Tropical pela realização das análises de caracterização dos óleos essenciais.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal. A toda equipe do laboratório de pós-colheita e de fitopatologia, que muito me ajudaram na análise e condução de experimentos, especialmente ao bolsista Antônio Gabriel, que ajudou muito no tempo em que trabalhamos juntos. À Dr. Mariuccia, a qual fez parte da equipe do laboratório de pós-colheita do CAV, inclusive me ajudando em diversas análises, hoje, agradeço por fazer parte da minha banca de avaliação, como pesquisadora da EPAGRI.

Ao Fumdes, pela concessão da bolsa no Brasil, e a CAPES e ao US Forest, pela concessão de bolsa no exterior.

Ao Dr. Argenta, agradeço por todo conhecimento repassado ao longo de anos e, especialmente, agradeço pela indicação ao laboratório USDA/ARS em Wenatchee, WA, EUA, para a realização do doutorado sanduíche.

Ao pesquisador James Mattheis, com quem muito aprendi no tempo de estudos no exterior, além de supervisor do doutorado sanduíche, é um grande amigo. Ao pesquisador David Ruddel, sempre disponível a ajudar e ensinar todo o tempo em que estive no exterior. A toda equipe do laboratório USDA/ARS, em especial a Janie, uma grande amiga, Brenda e David Buchanan, por toda ajuda e paciência nas análises de dados, e a Shashika, que além de longas conversas, muito me ajudou com busca de diversos artigos científicos.

Enfim, a todos que de uma forma ou de outra contribuíram para minha formação, têm minha gratidão.

## RESUMO

VIEIRA, Amanda M. F. Drehmer, **Óleos essenciais e substâncias alternativas no manejo de podridões pós-colheita de maçãs ‘Fuji’**. 2016. 87 f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal – Área: Biologia e Tecnologia Pós-Colheita) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias, Lages, 2016.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da aplicação pré-colheita de produtos alternativos (experimentos 1, 2 e 3) e aplicação pós-colheita de óleos essenciais (experimentos 4 e 5) sobre a incidência e a severidade de podridões pós-colheita e a maturação e qualidade de maçãs ‘Fuji’. Macieiras ‘Fuji’ foram pulverizadas em pré-colheita com produtos alternativos, em dois experimentos. No experimento 1, os tratamentos avaliados foram controle (água), acibenzolar-S-metil (ASM, 30 mg L<sup>-1</sup>, Bion<sup>®</sup>), extrato cítrico (2 mL L<sup>-1</sup>, Ecolife<sup>®</sup>), quitosana (10 g L<sup>-1</sup>), ácido abscísico (ABA, 0,1 mL L<sup>-1</sup>, Protone<sup>®</sup>), mananoligossacarídeo fosforilado de *Saccharomyces cerevisiae* (6 mL L<sup>-1</sup>, Agromos<sup>®</sup>) e *Bacillus subtilis* (10 mL L<sup>-1</sup>, Serenade<sup>®</sup>). No experimento 2, foram avaliados os tratamentos controle, ASM (60 e 120 mg L<sup>-1</sup>) e mananoligossacarídeo fosforilado de *Saccharomyces cerevisiae* (1 e 2 mL L<sup>-1</sup>). Uma amostra de 20 frutos por parcela foi inoculada com *Penicillium expansum* (mofo-azul) ou *Criptosporiopsis perennans* (olho-de-boi), e os frutos avaliados quanto a severidade de infecção na colheita e após o armazenamento refrigerado (0 ± 0,5 °C / UR de 90±2%). Uma amostra de 40 frutos não inoculados, foi avaliada quanto aos atributos de maturação na colheita e qualidade após o armazenamento refrigerado, seguido por sete dias em condição ambiente (22 ± 4 °C / UR de 70±5%). No experimento 3, foi avaliado o efeito de ASM (30 mg L<sup>-1</sup>, Bion<sup>®</sup>) extrato cítrico (2 mL L<sup>-1</sup>, Ecolife<sup>®</sup>), ABA (0,1 mL L<sup>-1</sup>, Protone<sup>®</sup>), mananoligossacarídeo fosforilado de *Saccharomyces cerevisiae* (6 mL L<sup>-1</sup>, Agromos<sup>®</sup>) e *Bacillus subtilis* (10 mL L<sup>-1</sup>, Serenade<sup>®</sup>) sobre o crescimento *in vitro* de *P. expansum*. As substâncias foram incorporadas ou não (controle) em meio de cultura BDA contendo um disco de isolado de *P. expansum*. Foi avaliado o crescimento micelial (cm) aos 3 e 7 dias após a incubação. No experimento 4, óleos essenciais de alecrim (*Rosmarinus officinalis*), canela (*Cinnamomum zeylacium*), citronela (*Cymbopogon winterianus*), limão (*Citrus limonium*), tangerina (*Citrus reticulata*), cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), eucalipto (*Eucalyptus citriodora*) e gengibre (*Zingiber officinale*) foram vaporizados ou não (controle) por 30 ou 2 dias sob refrigeração em maçãs ‘Fuji’ inoculadas e não inoculadas com *P. expansum*. A severidade de mofo-azul foi avaliada após o armazenamento refrigerado dos frutos inoculados. Atributos de qualidade foram avaliados em frutos não inoculados após 4 meses de armazenamento refrigerado, seguido por sete dias em condição ambiente. No experimento 5, com o objetivo de avaliar o perfil de compostos voláteis de frutos tratados com óleos essenciais, maçãs ‘Fuji’ foram tratadas ou não (controle) com óleos essenciais de canela (*Cinnamomum verum*), cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), citronela (*Cymbopogon winterianus*) ou alecrim (*Rosmarinus officinalis*) por imersão (2.000 e 4.000 µL L<sup>-1</sup> por 3 minutos) ou volatilização (100 µL L<sup>-1</sup> por 72 horas). Após quatro meses de armazenamento refrigerado (0 ± 0,5 °C / UR de 90±2%), seguidos por sete dias em condição ambiente (23 ± 0,5 °C / UR de 80 ± 2%), avaliou-se o perfil de compostos voláteis e a taxa de produção de etileno dos frutos. Nos experimentos 1 e 2, observou-se que todos os produtos alternativos reduziram a severidade de mofo-azul e olho-de-boi, exceto ASM, que não teve efeito sobre o tamanho de lesão em algumas datas de avaliação. ASM e ABA não afetaram o crescimento de *P. expansum in vitro*. Os tratamentos com mananoligossacarídeo fosforilado de *S. cerevisiae*, ABA e *B. subtilis* aumentaram a degradação do amido dos frutos na colheita e reduziram a firmeza de polpa após o armazenamento refrigerado. Todos os óleos essenciais testados reduziram a severidade de mofo-azul *in vivo*, sendo o efeito dependente da dose. O tratamento com óleos essenciais modificou o perfil de compostos voláteis e afetou a taxa de produção de etileno nos frutos. Produtos alternativos aplicados em pré-colheita, bem como óleos essenciais aplicados em pós-colheita, apresentam potencial para o controle de podridões pós-colheita em maçãs ‘Fuji’.

**Palavras-chave:** *Malus domestica* Borkh. *Penicillium expansum* Link. *Criptonoriopsis perennans* (Zeller & Childs) Wollenweber. Compostos voláteis.

## ABSTRACT

VIEIRA, Amanda M. F. Drehmer, **Natural substances and alternative products for postharvest management of diseases in 'Fuji' apples.** 2016. 87 p. Thesis (Doctorate in Plant Science – Area: Postharvest Biology and Technology) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Graduation Program in Plant Sciences, Lages, 2016.

The aim of this study was to evaluate the effect of preharvest application of alternative products and postharvest application of essential oils on the incidence and severity of postharvest rots and maturity and quality of the fruit in 'Fuji' apples. 'Fuji' apple trees were sprayed at preharvest with alternative products, in two experiments. In experiment 1, the treatments were control (water), acibenzolar-S-methyl (ASM, 30 mg L<sup>-1</sup>, Bion<sup>®</sup>), citrus extract (2 mL L<sup>-1</sup>, Ecolife<sup>®</sup>), chitosan (10 g L<sup>-1</sup>), abscisic acid (ABA, 0.1 mL L<sup>-1</sup> Protone<sup>®</sup>), mannan oligosaccharides phosphorylated of *Saccharomyces cerevisiae* (6 mL L<sup>-1</sup> Agromos<sup>®</sup>) and *Bacillus subtilis* (10 mL L<sup>-1</sup> Serenade<sup>®</sup>). In experiment 2, the treatments were control, ASM (60 and 120 mg L<sup>-1</sup>) and mannan oligosaccharides phosphorylated of *Saccharomyces cerevisiae* (1 and 2 mL L<sup>-1</sup>). Samples of 20 fruits per plot were inoculated with *Penicillium expansum* (blue mold) or *Criptonoriopsis perennans* (bull's eye rot) and evaluated for decay severity at harvest and after cold storage (0 ± 0.5 °C / 90 ± 2% RH). Sample of 40 fruit were left non-inoculated and assessed for maturity attributes at harvest and quality after cold storage followed for seven days of shelf life (22 ± 4 °C / 70 ± 5% RH). In experiment 3, *in vitro* growth of *P. expansum* was assessed in response to treatments with ASM (30 mg L<sup>-1</sup>, Bion<sup>®</sup>), citric extract (2 mL L<sup>-1</sup>, Ecolife<sup>®</sup>), ABA (0.1 mL L<sup>-1</sup>, Protone<sup>®</sup>), mannan oligosaccharides phosphorylated of *Saccharomyces cerevisiae* (6 mL L<sup>-1</sup>, Agromos<sup>®</sup>) and *Bacillus subtilis* (10 mL L<sup>-1</sup>, Serenade<sup>®</sup>). The substances were incorporated or not (control) on PDA culture medium containing a disc with an isolate of *P. expansum*. Mycelial growth (cm) was assessed 3 and 7 days after incubation. In experiment 4, essential oils of rosemary (*Rosmarinus officinalis*), cinnamon (*Cinnamomum zeylacium*), citronella (*Cymbopogon winterianus*), lemon (*Citrus limonium*), mandarin (*Citrus reticulata*), clove (*Syzygium aromaticum*), eucalyptus (*Eucalyptus citriodora*) and ginger (*Zingiber officinale*) were vaporized or not (control) for 30 or 2 days under refrigeration in 'Fuji' apple fruit, inoculated and non-inoculated with *P. expansum*. The blue mold severity was evaluated in inoculated fruit after cold storage. Quality attributes were evaluated in non-inoculated fruit after 4 months of cold storage, followed by seven days of shelf life. In experiment 5, to evaluate the volatiles profile of 'Fuji' apple fruit treated with essential oils, fruit were left untreated (control) or treated with cinnamon (*Cinnamomum verum*), clove (*Syzygium aromaticum*), citronella (*Cymbopogon winterianus*) or rosemary (*Rosmarinus officinalis*) essential oils by immersion (2,000 and 4,000 µL L<sup>-1</sup> for 3 minutes) or volatilization (100 µL L<sup>-1</sup> for 72 hours). After four months of cold storage (0 ± 0.5 °C / 90 ± 2% RH) plus seven days of shelf life (23 ± 0.5 °C / 80 ± 2% RH) the profile of volatiles and the rate of ethylene production of the fruit were evaluated. In experiments 1 and 2, fruit treated with all alternative products had reduced severity of blue mold and bull's eye rot, except ASM, which had no effect on the decay size in some evaluation dates. ASM and ABA did not affect the *in vitro* growth of *P. expansum*. The treatments with mannan oligosaccharides phosphorylated of *S. cerevisiae*, ABA and *B. subtilis* increased fruit starch degradation at harvest and reduced flesh firmness after cold storage. All the essential oils evaluated reduced *in vivo* the severity of blue mold, with the effect dependent on essential oil dose. The treatment with essential oils modified the volatile compounds profile and affect the rate of ethylene production of the fruit. Alternative products sprayed at preharvest as well as essential oils applied in postharvest have potential for the postharvest control of diseases in 'Fuji' apples.

**Keywords:** *Malus domestica* Borkh. *Penicillium expansum* Link. *Criptonoriopsis perennans* (Zeller & Childs) Wollenweber. Volatile Compounds.

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Diâmetro de lesão (cm) em maçãs ‘Fuji’ tratadas em pré-colheita com diferentes produtos alternativos e inibição do crescimento (IC, %) de mofo-azul em maçãs inoculadas 2 dias após a colheita com o fungo *Penicillium expansum*. Os frutos foram mantidos a  $22\pm 4^{\circ}\text{C}$  e umidade relativa de  $70\pm 5\%$ . Safra 2013..... 27
- Tabela 2 - Diâmetro de lesão (cm) em maçãs ‘Fuji’ tratados em pré-colheita com diferentes produtos alternativos e inibição do crescimento (IC, %) de frutos inoculados com o fungo *Penicillium expansum*. Os frutos foram mantidos a  $22^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$  e umidade relativa de  $70\pm 5\%$ . Safra 2014..... 27
- Tabela 3 - Modelos lineares para diâmetro de lesão de *Penicillium expansum* inoculado em maçãs ‘Fuji’, em função dos dias após a inoculação, para cada tratamento com produtos alternativos..... 28
- Tabela 4 - Diâmetro de lesão (cm) em maçãs ‘Fuji Kiku’ tratadas em pré-colheita com acibenzolar-S-metil (ASM) e *Sacharomyces cerevisiae* em duas doses mais o controle (frutos colhidos de plantas não tratadas com produtos alternativos) e inibição do crescimento de mofo-azul (IC, %) em frutos inoculados na colheita com o fungo *Penicillium expansum*. Os frutos foram mantidos a uma temperatura de  $22\pm 4^{\circ}\text{C}$  e uma umidade relativa de  $70\pm 5\%$  por nove dias..... 30
- Tabela 5 - Diâmetro de lesão (cm) após o armazenamento refrigerado de maçãs ‘Fuji’ tratadas em pré-colheita com diferentes produtos alternativos e inibição de crescimento de mofo-azul ou olho-de-boi (IC, %) em frutos inoculados com o fungo *Penicillium expansum* ou *Cryptosporiopsis perennans*, respectivamente. Os frutos foram mantidos 55 ou 115 dias a  $0\pm 0,5^{\circ}\text{C}$  e umidade relativa de  $95\pm 3\%$  mais 3 ou 7 dias a  $22\pm 4^{\circ}\text{C}$  e umidade relativa de  $70\pm 5\%$ , para *P. expansum* ou *C. perennans*, respectivamente. Safra 2014..... 31
- Tabela 6 - Diâmetro de lesão (cm) em maçãs ‘Fuji’ tratadas em pré-colheita com acibenzolar-S-metil (ASM) e *Sacharomyces cerevisiae* em duas doses mais o controle (frutos colhidos de plantas não tratadas com produtos alternativos) e inibição do crescimento (IC, %) em frutos inoculados com o fungo *Penicillium expansum*. Os frutos foram mantidos por 60 dias a uma temperatura de  $0\pm 0,5^{\circ}\text{C}$  e umidade relativa de  $90\pm 2\%$  mais 3 dias a temperatura ambiente ( $22\pm 4^{\circ}\text{C}$ , UR  $70\pm 5\%$ )..... 32
- Tabela 7 - Diâmetro de colônia (cm) e inibição do crescimento (IC, %) de *Penicillium expansum* em meio de cultura batata dextrose ágar (BDA) com acréscimo de diferentes produtos alternativos..... 33
- Tabela 8 - Incidência de podridões causadas por *Penicillium expansum* (mofo-azul), *Cryptosporiopsis perennans* (olho-de-boi), *Botrytis cinerea* (mofo-cinza) e o somatório de outras podridões, causadas por *Rhizopus* sp., *Alternaria* sp. e *Colletotrichum gloeosporioides* em maçãs ‘Fuji’ após 5 meses de armazenamento refrigerado ( $0\pm 0,5^{\circ}\text{C}$  UR  $90\pm 2\%$ ). Safras 2013 e 2014 ..... 35
- Tabela 9 - Atributos de qualidade e maturação de maçãs ‘Fuji’ na colheita. Os frutos tiveram 4 pulverizações (uma por semana) em pré-colheita com diferentes produtos alternativos. Avaliações realizadas 1 dia após a colheita. Safras 2013 e 2014..... 36



- Tabela 10 - Atributos de coloração da epiderme de maçãs ‘Fuji’ na colheita. Os frutos receberam quatro pulverizações em pré-colheita, uma por semana, com diferentes produtos alternativos. Avaliações realizadas um dia após a colheita. Safras 2013 e 2014..... 37
- Tabela 11 - Atributos de qualidade de maçãs ‘Fuji’ após o armazenamento refrigerado ( $0\pm 0,5^{\circ}\text{C}$  UR  $90\pm 2\%$ ) mais sete dias a temperatura ambiente ( $22\pm 4^{\circ}\text{C}$ , UR  $70\pm 5\%$ ). Os frutos receberam quatro pulverizações (uma por semana) em pré-colheita com diferentes produtos alternativos. Safras 2013 e 2014 ..... 38
- Tabela 12 - Atributos de maturação de maçãs ‘Fuji’ na colheita. Os frutos foram pulverizados ou não (controle) em pré-colheita com Acibenzolar-S-metil (ASM; 60 e 120 mg L<sup>-1</sup>) e mananoligossacarídeo fosforilado de *Sacharomyces cerevisiae* (Agromos®; 1 e 2 mL L<sup>-1</sup>) (quatro pulverizações, uma por semana). Avaliações realizadas um dia após a colheita... ..... 38
- Tabela 13 - Atributos de coloração de maçãs ‘Fuji’ na colheita. Os frutos foram pulverizados ou não (controle) em pré-colheita com Acibenzolar-S-metil (ASM; Bion® 60 e 120 mg L<sup>-1</sup>) e mananoligossacarídeo fosforilado de *Sacharomyces cerevisiae* (Agromos®; 1 e 2 mL L<sup>-1</sup>) (quatro pulverizações, uma por semana). Avaliações realizadas um dia após a colheita... ..... 39
- Tabela 14 - Atributos de qualidade pós-colheita de maçãs ‘Fuji’ após cinco meses de armazenamento refrigerado ( $0\pm 0,5^{\circ}\text{C}$  UR  $90\pm 2\%$ ) mais sete dias a temperatura ambiente ( $22\pm 4^{\circ}\text{C}$ , UR  $70\pm 5\%$ ). Os frutos foram pulverizados ou não (controle) em pré-colheita com Acibenzolar-S-metil (ASM; 60 e 120 mg L<sup>-1</sup>) e mananoligossacarídeo fosforilado de *Sacharomyces cerevisiae* (Agromos®; 1 e 2 mL L<sup>-1</sup>) (quatro pulverizações, uma por semana)..... 39
- Tabela 15 - Composição química dos óleos essenciais de alecrim (*Rosmarinus officinalis*), canela (*Cinnamomum zeylacium*), citronela (*Cymbopogon winterianus*) e cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) utilizados neste estudo ..... 45
- Tabela 16 - Composição química dos óleos essenciais de eucalipto (*Corymbia citriodora*), gengibre (*Zingiber officinale*), limão (*Citrus limonium*) e tangerina (*Citrus reticulata*) utilizados neste estudo ..... 46
- Tabela 17 - Número de esporos (\*10<sup>6</sup>) e viabilidade (%) 24 e 48 horas após o estímulo a germinação (meio de cultura BDA, mantido em B.O.D. a 23 °C e fotoperíodo de 12 horas) de esporos do fungo *Penicillium expansum* Link cultivado em B.O.D. por 10 dias (23 °C, fotoperíodo de 12 horas) em meio de cultura BDA com diferentes óleos essenciais volatilizados nas doses de 100 e 1.000 µL L<sup>-1</sup> ..... 49
- Tabela 18 - Dose efetiva mediana (ED<sub>50</sub>; µL L<sup>-1</sup>), equações de regressão e coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>) de óleos essenciais de alecrim (*Rosmarinus officinalis*), canela (*Cinnamomum zeylacium*), citronela (*Cymbopogon winterianus*), eucalipto (*Corymbia citriodora*) e limão (*Citrus limonium*), para a inibição *in vitro* do crescimento micelial de *Penicillium expansum* Link ..... 49
- Tabela 19 - Taxa de produção de etileno (µmol kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) de maçãs ‘Fuji’ tratadas por imersão em duas doses (2.000 e 4.000 µL L<sup>-1</sup>) com os óleos essenciais de canela (*Cinnamomum verum*), cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), citronela (*Cymbopogon winterianus*), alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e dois tratamentos controle (controle 1 – frutos imersos em solução sem óleo essencial e controle 2 – frutos sem imersão); e tratadas por volatilização com a dose de 100 µL L<sup>-1</sup> dos óleos de canela (*Cinnamomum cassia*), citronela

(*Cymbopogon winterianus*) e dois tratamentos controle (controle 1 – frutos mantidos em recipiente de tratamento sem óleo essencial e controle 2 – frutos mantidos sob refrigeração) ..... 63

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Inibição do crescimento (IC; %) *in vitro* de *Penicillium expansum* Link, aos 6 e 10 dias após o isolamento, cultivado em meio de cultura BDA, incubado em B.O.D. a 23 °C com fotoperíodo de 12 horas, na presença de óleos essenciais volatilizados de diferentes espécies de plantas, nas doses de 1000  $\mu\text{L L}^{-1}$  e 100  $\mu\text{L L}^{-1}$ . Barras com a mesma letra em cada dose e data de avaliação não diferem pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Letras seguidas de \* não diferem do tratamento controle (IC=0%) pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) ..... 47
- Figura 2 - Colônias de *Penicillium expansum* após 10 dias de incubação com diferentes óleos essenciais volatilizados na dose de 1.000  $\mu\text{L L}^{-1}$ . As letras correspondem ao tratamento com os seguintes óleos essenciais: A – controle, B – limão, C – gengibre, D – tangerina, E – citronela, F – canela, G – alecrim, H – eucalipto e I – cravo-da-índia ..... 48
- Figura 3 - Diâmetro de lesão de mofo-azul (*Penicillium expansum* Link.) em maçãs ‘Fuji’ tratadas com 0, 50, 100 e 500  $\mu\text{L L}^{-1}$  de óleos essenciais de alecrim, canela, citronela e cravo, após 30 dias de armazenamento refrigerado na presença dos óleos essenciais ( $0 \pm 0,5$  °C UR  $90 \pm 2\%$ ), mais cinco dias à temperatura ambiente sem óleos essenciais ( $23 \pm 5$  °C UR  $70 \pm 5\%$ ). Diâmetro de lesão avaliado aos 0, 1, 2, 3 e 5 dias após o armazenamento refrigerado. Barras verticais indicam a diferença mínima significativa entre as médias das diferentes doses pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) ..... 51
- Figura 4 - Diâmetro de lesão de mofo-azul (*Penicillium expansum* Link.) em maçãs ‘Fuji’ tratadas com 0, 50, 100 e 500  $\mu\text{L L}^{-1}$  de óleos essenciais de eucalipto, gengibre, limão e tangerina, após 30 dias de armazenamento refrigerado na presença dos óleos essenciais ( $0 \pm 0,5$  °C UR  $90 \pm 2\%$ ) mais cinco dias à temperatura ambiente sem óleos essenciais ( $23 \pm 4$  °C UR  $70 \pm 5\%$ ). Diâmetro de lesão avaliado aos 0, 1, 2, 3 e 5 dias após o armazenamento refrigerado. Barras verticais indicam a diferença mínima significativa entre as médias das diferentes doses pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) ..... 52
- Figura 5 - Diâmetro de lesão de mofo-azul (*Penicillium expansum* Link.) em maçãs ‘Fuji’ tratadas com 0, 100 e 500  $\mu\text{L L}^{-1}$  de óleos essenciais de alecrim, canela, citronela e cravo, após 45 dias de armazenamento refrigerado ( $0 \pm 0,5$  °C URA=95%) (dois dias na presença dos óleos) mais seis dias à temperatura ambiente ( $23 \pm 4$  °C UR  $70 \pm 5\%$ ). Barras verticais indicam a diferença mínima significativa entre as médias das diferentes doses pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) ..... 53
- Figura 6 - Diâmetro de lesão de mofo-azul (*Penicillium expansum* Link.) em maçãs ‘Fuji’ tratadas com 0, 100 e 500  $\mu\text{L L}^{-1}$  de óleos essenciais de eucalipto, gengibre, limão e tangerina, após 45 dias de armazenamento refrigerado ( $0 \pm 1$  °C UR  $90 \pm 2\%$ ) (dois dias na presença dos óleos) mais seis dias à temperatura ambiente ( $23 \pm 4$  °C UR  $70 \pm 5\%$ ). Barras verticais indicam a diferença mínima significativa entre as médias dos diferentes tratamentos pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) ..... 54
- Figura 7 - *Heatmap* demonstrando a análise de *clusters* usando o algoritmo de *clustering* de Ward e distância Euclidiana calculados a partir de dados em  $\text{ng kg}^{-1} \text{L}^{-1}$ . Os compostos foram agrupados conforme as similaridades nas flutuações, as quais foram afetadas pelo tratamento pós-colheita por imersão dos frutos em óleo essencial. As classes 1 e 2 indicam as doses dos óleos essenciais de 2.000 e 4.000  $\mu\text{L L}^{-1}$ , respectivamente. Os óleos essenciais utilizados foram cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), citronela (*Cymbopogon winterianus*), canela (*Cinnamomum verum*), alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e dois tratamentos controle,

controle 1 com frutos imersos em surfactante sem óleo essencial e controle 2 com frutos sem imersão. Os compostos foram coletados após quatro meses de armazenamento refrigerado ( $0\pm 0,5^{\circ}\text{C}/\text{UR } 90\pm 2\%$ ) mais sete dias em condições ambiente ( $23\pm 0,5^{\circ}\text{C}/\text{UR } 80\pm 2\%$ ). Os dados tiveram as médias centralizadas e divididas pela raiz quadrada do desvio padrão de cada composto antes da análise de *clusters* (*pareto scaling*). O gradiente de coloração indica os níveis relativos dos compostos de baixo até elevado ..... 67

Figura 8 - *Heatmap* demonstrando a análise de *clusters* usando o algoritmo de *clustering* de Ward e distância Euclidiana calculados a partir de dados em percentual. Os compostos foram agrupados conforme as similaridades nas flutuações, as quais foram afetadas pelo tratamento pós-colheita por imersão dos frutos em óleo essencial. As classes 1 e 2 indicam as doses dos óleos essenciais de 2.000 e 4.000  $\mu\text{L L}^{-1}$ , respectivamente. Os óleos essenciais utilizados foram cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), citronela (*Cymbopogon winterianus*), canela (*Cinnamomum verum*), alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e dois tratamentos controle, controle 1 com frutos imersos em surfactante sem óleo essencial e controle 2 com frutos sem imersão. Os compostos foram coletados após quatro meses de armazenamento refrigerado ( $0\pm 0,5^{\circ}\text{C}/\text{UR } 90\pm 2\%$ ) mais sete dias em condições ambiente ( $23\pm 0,5^{\circ}\text{C}/\text{UR } 80\pm 2\%$ ). Os dados tiveram as médias centralizadas e divididas pela raiz quadrada do desvio padrão de cada composto antes da análise de *clusters* (*pareto scaling*). O gradiente de coloração indica os níveis relativos dos compostos de baixo até elevado ..... 68

Figura 9 - *Heatmap* demonstrando a análise de *clusters* usando o algoritmo de *clustering* de Ward e distância Euclidiana calculados a partir de dados em  $\text{ng kg}^{-1} \text{L}^{-1}$ . Os compostos foram agrupados conforme as similaridades nas flutuações, as quais foram afetadas pelo tratamento pós-colheita dos frutos com óleo essencial volatilizado em recipiente hermeticamente fechado na dose de 100  $\mu\text{L L}^{-1}$ . Os óleos essenciais utilizados foram canela (*Cinnamomum verum*), citronela (*Cymbopogon winterianus*) e dois tratamentos controle, controle 1 em que os frutos permaneceram no recipiente hermeticamente fechado sem óleo essencial e controle 2 em que os frutos permaneceram fora do recipiente de tratamento. Os compostos foram coletados após quatro meses de armazenamento refrigerado ( $0\pm 0,5^{\circ}\text{C}/\text{UR } 90\pm 2\%$ ) mais sete dias em condições ambiente ( $23\pm 0,5^{\circ}\text{C}/\text{UR } 80\pm 2\%$ ). Os dados tiveram as médias centralizadas e divididas pela raiz quadrada do desvio padrão de cada composto antes da análise de *clusters* (*pareto scaling*). O gradiente de coloração indica os níveis relativos dos compostos de baixo até elevado ..... 69

Figura 10 - *Heatmap* demonstrando a análise de *clusters* usando o algoritmo de *clustering* de Ward e distância Euclidiana calculados a partir de dados em percentual. Os compostos foram agrupados conforme as similaridades nas flutuações, as quais foram afetadas pelo tratamento pós-colheita dos frutos com óleo essencial volatilizado em recipiente hermeticamente fechado na dose de 100  $\mu\text{L L}^{-1}$ . Os óleos essenciais utilizados foram canela (*Cinnamomum verum*), citronela (*Cymbopogon winterianus*) e dois tratamentos controle, controle 1 em que os frutos permaneceram no recipiente hermeticamente fechado sem óleo essencial e controle 2 em que os frutos permaneceram fora do recipiente de tratamento. Os compostos foram coletados após quatro meses de armazenamento refrigerado ( $0\pm 0,5^{\circ}\text{C}/\text{UR } 90\pm 2\%$ ) mais sete dias em condições ambiente ( $23\pm 0,5^{\circ}\text{C}/\text{UR } 80\pm 2\%$ ). Os dados tiveram as médias centralizadas e divididas pela raiz quadrada do desvio padrão de cada composto antes da análise de *clusters* (*pareto scaling*). O gradiente de coloração indica os níveis relativos dos compostos de baixo até elevado ..... 70

Figura 11 - *Heatmap* demonstrando a análise de *clusters* usando o algoritmo de *clustering* de Ward e distância Euclidiana calculados a partir de dados em  $\text{ng kg}^{-1} \text{L}^{-1}$ . Os compostos foram agrupados conforme as similaridades nas flutuações, as quais foram afetadas pelo tratamento pós-colheita dos frutos com óleo essencial volatilizado em recipiente hermeticamente

fechado na dose de 100  $\mu\text{L L}^{-1}$ . Os compostos foram coletados a partir dos recipientes de tratamento com os óleos essenciais de canela (*Cinnamomum verum*), citronela (*Cymbopogon winterianus*) e um tratamento controle em que os frutos permaneceram no recipiente hermeticamente fechado sem óleo essencial. Os dados tiveram as médias centralizadas e divididas pela raiz quadrada do desvio padrão de cada composto antes da análise de *clusters* (*pareto scaling*). O gradiente de coloração indica os níveis relativos dos compostos de baixo até elevado..... 71

Figura 12 - *Heatmap* demonstrando a análise de *clusters* usando o algoritmo de *clustering* de Ward e distância Euclidiana calculados a partir de dados em percentual. Os compostos foram agrupados conforme as similaridades nas flutuações, as quais foram afetadas pelo tratamento pós-colheita dos frutos com óleo essencial volatilizado em recipiente hermeticamente fechado na dose de 100  $\mu\text{L L}^{-1}$ . Os compostos foram coletados a partir dos recipientes de tratamento com os óleos essenciais de canela (*Cinnamomum verum*), citronela (*Cymbopogon winterianus*) e um tratamento controle em que os frutos permaneceram no recipiente hermeticamente fechado sem óleo essencial. Os dados tiveram as médias centralizadas e divididas pela raiz quadrada do desvio padrão de cada composto antes da análise de *clusters* (*pareto scaling*). O gradiente de coloração indica os níveis relativos dos compostos de baixo até elevado..... 72

## LISTA DE ABREVIATURAS

1-MCP	1-metilciclopropeno
<i>a</i>	intercepto
ABA	ácido abscísico
AC	atmosfera controlada
ACC	ácido 1-carboxi-1-amino-ciclopropano
ASM	acibenzolar-S-metil
AT	acidez titulável
<i>b</i>	coeficiente angular da reta
BABA	ácido β-amino butírico
BDA	batata dextrose ágar
BOD	incubadora de demanda bioquímica de oxigênio
°Brix	graus Brix
°C	graus Celsius
C	concentração
<i>C</i>	cromaticidade
CA	Califórnia
CE	Ceará
cm	centímetros
Co	company
Cu	cobre
Dc	diâmetro de colônia controle
DNA	ácido desoxirribonucleico
DPA	difenilamina
Dt	diâmetro de colônia tratamento
ED <sub>50</sub>	dose efetiva mediana
EUA	Estados Unidos da América
FE	fengicins
GC	cromatografia gasosa
h	hora
<i>h°</i>	ângulo <i>hue</i>
H <sub>2</sub>	hidrogênio
ha	hectares
HP	Hewlett-Packard
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peróxido de hidrogênio
IC	inibição de crescimento
IK	índice Kovats
IT	iturins
kg	quilogramas
L	litros
<i>L</i>	<i>lightness</i>
LOX	lipoxigenase
MD	Maryland
mg	miligramas
min	minutos
mm	milímetros
mM	milimol
mL	mililitros
µg	microgramas
µL	microlitros
µmol	Micromol

MS	espectrometria de massa
N <sub>2</sub>	nitrogênio
N	Newton
N	normal
ng	nano gramas
NaOH	hidróxido de sódio
PA	Pensilvânia
PAL	fenilalanina amônia-liase
p	probabilidade
pH	potencial hidrogeniônico
RLA	resistência local adquirida
RS	Rio Grande do Sul
RSA	resistência sistêmica adquirida
RSI	resistência sistêmica induzida
s	segundos
SAS	<i>Statistical Analysis System</i>
SF	surfactins
SS	sólidos solúveis
TDS	<i>Thermal Desorption System</i>
UR	umidade relativa do ar
v	volume
WG	granulado dispersível
%	percentual
≥	maior ou igual
~	aproximadamente

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INDRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>18</b>
<b>2</b>	<b>USO DE PRODUTOS ALTERNATIVOS EM PRÉ E PÓS-COLHEITA NA REDUÇÃO DE PODRIDÕES PÓS-COLHEITA EM MAÇÃ ‘FUJI’ .....</b>	<b>22</b>
2.1	RESUMO .....	22
2.2	INTRODUÇÃO.....	23
2.3	MATERIAL E MÉTODOS.....	24
2.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
2.4.1	<b>Efeito dos produtos alternativos nas podridões pós-colheita: frutos inoculados .....</b>	<b>26</b>
2.4.2	<b>Efeito dos produtos alternativos sobre o crescimento de <i>Penicillium expansum in vitro</i> .....</b>	<b>33</b>
2.4.3	<b>Efeito dos produtos alternativos sobre a incidência de podridões após o armazenamento refrigerado de maçãs não inoculada.....</b>	<b>34</b>
2.4.4	<b>Atributos de maturação na colheita e qualidade após o armazenamento refrigerado dos frutos.....</b>	<b>35</b>
2.5	CONCLUSÃO.....	39
<b>3</b>	<b>CONTROLE PÓS-COLHEITA DO MOFO-AZUL E QUALIDADE DE MAÇÃS ‘FUJI’ TRATADAS COM ÓLEOS ESSENCIAIS.....</b>	<b>40</b>
3.1	RESUMO .....	40
3.2	INTRODUÇÃO.....	40
3.3	MATERIAL E MÉTODOS.....	42
3.4	RESULTADOS .....	44
3.4.1	<b>Composição dos óleos essenciais.....</b>	<b>44</b>
3.4.2	<b>Efeito dos óleos essenciais sobre o crescimento de <i>Penicillium expansum in vitro</i> .....</b>	<b>46</b>
3.4.3	<b>Efeito dos óleos essenciais sobre o crescimento de <i>Penicillium expansum in vivo</i> .....</b>	<b>49</b>
3.4.3.1	<i>Efeito do tratamento por 30 dias .....</i>	<i>50</i>
3.4.3.2	<i>Efeito do tratamento por 2 dias .....</i>	<i>52</i>
3.4.4	<b>Efeito dos óleos essenciais sobre a qualidade pós-colheita dos frutos .....</b>	<b>55</b>
3.5	DISCUSSÃO.....	55
3.5.1	<b>Composição dos óleos essenciais.....</b>	<b>55</b>
3.5.2	<b>Experimentos <i>in vitro</i> .....</b>	<b>56</b>
3.5.3	<b>Experimentos <i>in vivo</i> .....</b>	<b>57</b>
3.5.4	<b>Efeito sobre a qualidade dos frutos .....</b>	<b>58</b>
3.6	CONCLUSÕES.....	58
<b>4</b>	<b>COMPOSTOS VOLÁTEIS EM MAÇÃS ‘FUJI’ TRATADAS COM ÓLEOS ESSENCIAIS .....</b>	<b>59</b>
4.1	RESUMO .....	59
4.2	INTRODUÇÃO.....	59
4.3	MATERIAL E MÉTODOS.....	60
4.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
4.5	CONCLUSÕES.....	73



<b>5</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>73</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>74</b>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

As maçãs ‘Fuji’, comparativamente a outras cultivares, como por exemplo maçãs ‘Gala’, são mais susceptíveis ao desenvolvimento de podridões durante armazenagem (VALDEBENITO-SANHUEZA et al., 2006). As podridões que ocorrem em pós-colheita podem ser iniciadas no campo ou nos períodos de colheita e pós-colheita (VALDEBENITO-SANHUEZA; BETTI, 2005). Os riscos de perdas por podridões aumentam com o atraso na colheita e com o prolongamento da armazenagem, mesmo sob condições de atmosfera controlada (AC). O índice médio de podridões de maçãs ‘Fuji’, após oito meses de armazenagem em AC, pode chegar a 7%, sendo que, dependendo do ano, os índices de perdas, somente por podridões, podem ser superiores a 20% (VALDEBENITO-SANHUEZA; SPOLTI; DEL PONTE, 2010). Em um estudo publicado recentemente, as perdas por podridão nas gôndolas dos supermercados podem variar de 4 a 10% para a cultivar Gala e 2 a 15% para a cultivar Fuji (ARGENTA et al., 2015).

Entre os agentes causais, destacam-se as podridões causadas pelos fungos *Penicillium expansum* Link. (Mofa-azul) e *Cryptosporiopsis perennans* (Zeller & Childs) Wollenweber (podridão olho-de-boi) (BLUM et al., 2004; VALDEBENITO-SANHUEZA, 2006).

Podridões causadas por *Cryptosporiopsis perennans* (olho-de-boi) podem causar perdas superiores a 18% na fase de armazenamento de maçãs ‘Fuji’ (VALDEBENITO-SANHUEZA, 2006; VALDEBENITO-SANHUEZA; SPOLTI; DEL PONTE, 2010). O mofa-azul também é responsável por elevadas perdas na fase de armazenamento e comercialização de frutos de macieira. Na década de 90, as perdas devido à infecção por *Penicillium expansum* podiam chegar a 90% devido, principalmente, a ineficiência na higienização e desinfecção das câmaras de armazenamento refrigerado dos frutos, além da menor utilização de câmaras com AC (ROSENBERGER, 1990; VALDEBENITO-SANHUEZA, 1991). Hoje, com as melhores condições de sanitização das câmaras frigoríficas, da água e dos equipamentos de processamento dos frutos e aumento na utilização de câmaras com AC, as perdas por mofa-azul reduziram para aproximadamente 5% no período de refrigeração (BLUM et al., 2007). Além das perdas, o fungo também é responsável pela produção da micotoxina patulina, que tem atividade citotóxica, imunossupressora e capaz de causar alterações genéticas em animais (LIMA et al., 2011). Mais recentemente, Medeiros (2015) descreveu que 47,6 e 13,3% das podridões identificadas em maçãs ‘Fuji’ é devido a ocorrência de *C. perennans* e *P. expansum*, respectivamente.

### **Podridão olho-de-boi:**

O patógeno causador da podridão-olho-de-boi é o fungo *Pezizula malicorticis* (H. Jaccks.) Nannf., sendo sua fase imperfeita *Cryptosporiopsis perennans* (Zeller & Childs) Wollenweber. A fase perfeita do fungo ainda não foi detectada no Brasil (VALDEBENITO-SANHUEZA, 2006). A forma imperfeita do fungo produz acérvulos e conídios hialinos e unicelulares. Nas condições de campo o patógeno pode sobreviver nos cancos de ramos infectados e se dispersar por respingos de chuva. A penetração nos frutos ocorre diretamente através da cutícula, apesar do processo ser facilitado pela ocorrência de ferimentos nos frutos (VALDEBENITO-SANHUEZA; BETTI, 2005).

O sintoma característico da infecção por *Cryptosporiopsis perennans* em maçãs é podridão de cor marrom-clara com centro amarelo pálido, de forma mais ou menos circular, às vezes com margens marrom-escura ou avermelhada, deprimida, de textura firme e desenvolvimento lento. No centro das lesões mais velhas, sob condições de umidade, podem desenvolver estruturas escuras que produzem massas de conídios branco-alaranjados (VALDEBENITO-SANHUEZA; BETTI, 2005).

### **Mofa-azul:**

O fungo causador desta doença é o *Penicillium expansum* Link. O fungo apresenta como característica a produção de conídios em conidióforos ramificados. Os sintomas característicos desta doença são podridões aquosa, mole, deprimida, profunda, com margens internas e externas bem definidas. Em condições de alta umidade, desenvolvem-se sobre a área afetada pequenas massas brancas e azuis constituídas de micélio e esporos do fungo. A podridão é de desenvolvimento rápido

e os tecidos afetados podem ser destacados facilmente dos frutos (VALDEBENITO-SANHUEZA; BETTI, 2005).

#### **Manejo de doenças pós-colheita:**

O manejo para a redução das perdas causadas por estas doenças incluem práticas como proteção adequada das macieiras no pomar, colheita cuidadosa e na época recomendada e utilização de desinfetantes, como hipoclorito de sódio, para higienização das embalagens, instalações e água de processamento dos frutos (VALDEBENITO-SANHUEZA; BETTI, 2005). Entretanto, nem sempre as empresas produtoras de maçãs conseguem seguir essas práticas de forma adequada e os patógenos infectam os frutos em elevados índices. Como prática adicional pode-se realizar a aplicação de fungicidas em pós-colheita (VALDEBENITO-SANHUEZA; BETTI, 2005). Contudo, a produção integrada de maçãs estabelece limites na aplicação e cumprimento do período de carência de agrotóxicos nos pomares e em pós-colheita (KOVALESKI et al., 2003). Além do mais, é crescente a preocupação dos consumidores pela aquisição de produtos mais saudáveis e seguros (BRAGA; NETO; MORAES, 2014).

Portanto, os produtos alternativos e os óleos essenciais apresentam-se como uma boa alternativa para reduzir a utilização de agrotóxicos no campo ou no período de armazenamento dos frutos.

#### **Indução de resistência e efeito antimicrobiano de substâncias naturais:**

A resistência natural na planta é dependente da existência de uma série de barreiras pré e pós-formadas. Os fatores de resistência pré-formados já existem na planta antes do contato com o patógeno, já os pós-formados estão inexistentes ou em baixos níveis na planta e têm sua produção aumentada ou são ativados em resposta ao contato entre a planta e o patógeno. Em ambas as categorias, os fatores de resistência podem ser bioquímicos ou estruturais. Os estruturais atuam como barreiras físicas aos patógenos e os bioquímicos agem como substâncias tóxicas ou repelentes aos patógenos, criando condições desfavoráveis ao estabelecimento destes na planta (AGRIOS, 2004).

As defesas da planta podem ser ativadas por agentes de origem biótica ou abiótica, de natureza orgânica ou inorgânica, capazes de atuar como indutores de resistência na planta. Essas moléculas capazes de ativar as respostas de defesa das plantas são chamadas de elicitores. Os elicitores podem induzir a resistência local adquirida (RLA), resistência sistêmica adquirida (RSA) ou a resistência sistêmica induzida (RSI) (TERRY; JOYCE, 2004).

Pesquisas com indução de resistência têm se multiplicado pelo mundo e vêm obtendo resultados promissores com as mais diversas culturas, como morango (MAZARO et al., 2008), mamão (TAVARES et al., 2009), tomate (SILVA; PASCHOLATI; BEDENDO, 2007) e pêssego (DANNER et al., 2008), entre outras.

Os genes de resistência levam a planta a aumentar a síntese de ácido salicílico, ácido jasmônico e etileno. O aumento na síntese de ácido salicílico está associado à RSA, o qual é um sinalizador na produção de determinadas proteínas relacionadas à patogenezidade (proteínas PR's). Na RSI ocorre a ativação de outros genes, portanto ocorre o incremento de ácido jasmônico e etileno (TERRY; JOYCE, 2004). A RSA é induzida por elicitores de origem abiótica, sendo comum a aplicação exógena de ácido salicílico e seus análogos, como o acibenzolar-S-metil, ou biótica, que conferem à planta resistência a uma variada gama de microrganismos, como fungos, bactérias ou vírus (BONALDO et al., 2005). A RSI normalmente é ativada por elicitores de origem biótica, sendo mais comuns as rizobactérias. O tempo necessário para efetivação da resistência à doença pode variar conforme a espécie vegetal e o agente indutor (MÉTRAUX; NAWRATH; GENOUD, 2002), bem como o tempo de duração da resistência depende, além deste, das condições ambientais (luz, umidade, temperatura, etc.) e do intervalo de tempo entre o tratamento com o elicitor e do contato planta-patógeno (GUZZO, 2003).

Na RSA há conhecidos mecanismos de resposta, como reação de hipersensibilidade (envolvendo a produção de formas reativas de oxigênio), modificações estruturais como a lignificação do tecido (DURRANT; DONG, 2004), acúmulo de proteínas relacionadas à patogênese, fenilpropanoides, metabólitos secundários, como fitoalexinas e compostos fenólicos, e ativação de

enzimas como peroxidases e a fenilalanina amônia-liase (CAVALCANTI; BRUNELLI; STANGARLIN, 2005).

Várias substâncias podem ser agentes indutores bióticos ou abióticos de resistência de plantas a pragas e patógenos. Já foi relatado em várias culturas efeito elicitor de resistência de substâncias como acibenzolar-S-metil (ASM) (RODRIGUES; BEZERRA; COELHO, 2006; MAZARO et al., 2008), quitosana (MAZARO et al., 2008; DI PIERO; GUARDA, 2008), proteína harpina (GALDEANO et al., 2010; TOMAZELI, 2010), ácido  $\beta$ -aminobutírico (BABA) (RODRIGUES; BEZERRA; COELHO, 2006), *Saccharomyces cerevisiae* (GOUVEA et al., 2009), extrato cítrico (Ecolife®) (BOAVA et al., 2010), *Bacillus subtilis* (MOREIRA; NESI, DE MIO, 2014; ONGENA; JACQUES, 2008) e metil jasmonato (COUTO, 2006). O agente indutor não atua diretamente sobre o patógeno e não é transformado em algum agente antimicrobiano, mas ele sensibiliza a planta a ativar seus mecanismos de defesa em resposta à presença de um patógeno (CONRATH; PIETERSE; MAUCH-MANI, 2002).

### Substâncias alternativas:

A quitosana é um polissacarídeo catiônico natural, não tóxico, derivado da quitina, ambos, com composição química semelhante a celulose, diferindo apenas pela presença ou ausência de nitrogênio (FREEPONS, 1991). A quitina é um abundante mucopolissacarídeo com função estrutural em crustáceos, insetos e fungos. Apresenta amplo potencial para utilização na indústria, tais como formação de filmes biodegradáveis, purificação de água, clariamento e desacidificação de sucos de frutas, preservação de alimentos contra deterioração microbiológica e ação antimicrobiana em frutos (RAVI, 2000). Diversos autores vêm relatando efeito antimicrobiano da quitosana e elicitor de respostas de defesa dos tecidos das plantas em vários patossistemas, como, damasco e *Burkholderia seminalis* (LOU, et al., 2011), tomate cereja e *Botrytis cinerea* (ZHANG et al., 2015), morango e *Botrytis cinerea* (MAZARO et al., 2008) e em uva de mesa e fungos causadores de podridões pós-colheita (MENG et al., 2008). Kong et al. (2010), estudando o modo de ação antifúngico de quitosana, relataram que esta possui afinidade com os lipídeos da membrana plasmática de microrganismos devido a sua característica catiônica, o que favorece a interação da quitosana com os componentes aniônicos da membrana plasmática de microrganismos, promovendo o extravasamento de líquidos intracelulares em microrganismos. Entretanto, a quitosana não possui atividade hemolítica, portanto, esta não possui efeito sobre células de mamíferos. Além disso, os autores observaram alterações morfológicas em células intactas dos fungos *Candida albicans* e *Fusarium oxysporum* devido o contato destas com quitosana (KONG et al., 2010).

*Saccharomyces cerevisiae* Meyen é uma levedura com potencial para induzir respostas relacionadas a defesa em diversas espécies de plantas (DANTAS et al., 2004; GOUVEA et al., 2009; COSTA et al., 2010). Produtos comerciais a base de *S. cerevisiae*, como AgroMos®, encontram-se disponíveis para utilização em diversas culturas. O AgroMos® possui como princípio ativo o manano-oligossacarídeo fosforilado derivado da parede celular da levedura *S. cerevisiae*, o qual pode ser utilizado em conjunto com fungicidas tradicionais, possibilitando reduzir o número de aplicação destes (DI PIERO; GARCIA; TONUCCI, 2005).

Produtos a base de extrato cítrico, vêm sendo testados e têm apresentado capacidade de controlar doenças de plantas, tanto por sua atividade antimicrobiana direta quanto indireta (STANGARLIN et al., 1999; FIORI et al., 2000). Alguns produtos comerciais a base de extrato cítrico, como Ecolife®, apresentam em sua composição ácidos ascórbico, láctico e cítrico, bioflavonóides cítricos, fitoalexinas cítricas, polifenóis e glicerina vegetal (Boletim Técnico Ecolife®).

*Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn é uma bactéria saprofítica, sem potencial patogênico a humanos, formadora de esporos, gram-positiva, comumente encontrada no solo, água, ar e material vegetal em decomposição. Cresce aerobicamente a temperaturas e pH intermediários (BOER; DIDERICHSEN, 1991). Diferentes raças de *B. subtilis* apresentam potencial como agentes de controle biológico, algumas são usadas em pulverizações aéreas e outras no solo ou substrato de semeadura (NORTH CAROLINA STATE UNIVERSITY, 2010). O Serenade® (AgraQuest, Davis, CA, EUA) é um produto comercial que possui como princípio ativo a raça QST 713 de *B. subtilis*, a

qual é de ocorrência natural em diversos locais. Foi isolada pela primeira vez em 1995 a partir do solo de um pomar de pêssegos na Califórnia, EUA, pela AgraQuest Inc (NORTH CAROLINA STATE UNIVERSITY, 2010). Diversos autores vêm mostrando resultados promissores no controle de doenças de plantas pelo uso de *B. subtilis* tanto pelo seu efeito antimicrobiano direto (MOREIRA; NESI; DE MIO, 2014; FIEDLER; HEERKLOTZ, 2015) ou indutor de resistência (KHONG et al., 2012).

Acibenzolar-S-metil (ASM) é um análogo sintético funcional do ácido salicílico, o qual tem a capacidade de ativar a defesa de diversas espécies de plantas a uma ampla gama de patógenos, através da resistência induzida pela rota bioquímica do ácido salicílico (VÉRONÉSI; DELAVAUULT; SIMIER, 2009). O ASM, também denominado ácido bezo (1,2,3) tiadiazole-7-carboxílico S-metil ester (BTH), é comercializado com o nome de Bion (Bion<sup>®</sup> 500WG Syngenta, Basel, Suíça) (ACHUO et al., 2004). É um produto não fitotóxico em baixas doses e, quando pulverizado um ou múltiplas vezes no período de pré-colheita, vem demonstrando eficiência no controle de doenças em pepino (COOLS; ISHII, 2002), batata (BOKSHI; MORRIS; DEVERALL, 2003), pêssego (LIU et al., 2005), pera (CAO; JIANG, 2006), tomate (IRITI; MAPELLI; FAORO, 2007) e melão (GE et al., 2008; WANG et al., 2008).

O ácido abscísico (ABA) é um hormônio vegetal produzido em quase todas as células vegetais que contém plastídeos. O ABA é um terpeno de 15 carbonos, originário a partir dos carotenóides, responsável por diversas funções nas plantas, como dormência de gemas e sementes, fechamento estomático, estimular a produção de etileno, dentre outras (TAIZ; ZEIGER, 2015). Nos últimos anos, diversos trabalhos têm sido realizados para avaliar o efeito do ABA no aumento da pigmentação de frutos de algumas espécies vegetais como uvas de mesa, uvas para vinho e lichia (MORI et al., 2005; HE; YU; MA, 2009; ROBERTO et al., 2012; SINGH et al., 2014). Diversos autores relataram que o efeito de melhora na pigmentação dos frutos está relacionada ao acúmulo de antocianinas na casca ou no pericarpo dos frutos (PEPPI; FIDELIBUS; DOKOOZLIAN, 2006; CANTÍN; FIDELIBUS; CRISOSTO, 2007; WHEELER et al., 2009; WEI et al., 2011; SINGH et al., 2014). O composto precursor da antocinina (fenilalanina) é, também, precursor de uma série de compostos relacionados à defesa vegetal, como ácido cafêico, ácido benzóico, lignina, entre outros, cuja a reação é metabolizada pela enzima relacionada à defesa vegetal, fenilalanina amônia-liase (TAIZ; ZEIGER, 2015). Portanto, acredita-se que a pulverização das plantas com ABA pode promover a indução da defesa vegetal e a redução da incidência e severidade de doenças pós-colheita.

### **Óleos essenciais:**

Os óleos essenciais são substâncias líquidas, oleosas, voláteis, naturais, com forte aroma quase sempre agradável e, além disso, são metabólitos secundários formados por plantas aromáticas (BAKKALI et al., 2008). Na natureza, óleos essenciais desempenham uma importante função na proteção de plantas contra bactérias, vírus, fungos e também contra herbívoros devido a redução de sua preferência por alimentar-se destas plantas. Óleos essenciais também podem ser atrativos a alguns insetos polinizadores e dispersores de sementes ou repeli-los quando são indesejáveis (BAKKALI et al., 2008; TAIZ; ZEIGER, 2015). Vários órgãos das plantas podem sintetizar óleos essenciais, por exemplo, gemas, flores, folhas, caules, sementes, frutos, raízes, tronco ou casca de árvores e são armazenados em células secretoras, cavidades, canais, células epidérmicas ou tricomas glandulares (ANGIONI et al., 2006). O modo de extração de óleos essenciais também pode variar, podendo ser extraídos através de hidrodestilação, solventes orgânicos, destilação a vapor, extração por fluido supercrítico e prensagem a frio (SILVEIRA et al., 2012).

O efeito dos óleos essenciais e extratos vegetais no controle de doenças em plantas pode estar relacionado a elicitação de resistência, bem como pode ser devido as propriedades antimicrobianas e fungistáticas (BONALDO et al., 2004; RODRIGUES et al., 2007). Estas propriedades podem ser utilizadas no manejo de fungos em frutos após a colheita. Estudos com capsaicina, metabólito secundário presente em pimentas do gênero *Capsicum*, demonstram efeito antifúngico *in vitro* na dose de 152 µg mL<sup>-1</sup> sobre os gêneros *Penicillium*, *Botrytis* e *Aspergillus* (PIOTROSKI et al., 2011). Rozwalka et al. (2008) observaram efeito fungitóxico *in vitro* de óleo essencial e extrato aquoso de cravo-da-índia sobre as espécies *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides*. Estudando

extrato aquoso de eucalipto nas concentrações de 5, 10, 15, 20 e 25%, os autores observaram que todas as concentrações inibiram 90% da germinação de esporos do fungo *Colletotrichum lagenarium* (BONALDO et al., 2004). Rodrigues et al. (2007) observaram que extrato aquoso de gengibre (*Zingiber officinalis*) nas concentrações de 5, 10, 15, 20 e 25% reduziu o crescimento micelial e a formação de esclerócios do fungo *Sclerotinia sclerotiorum in vitro*. Os óleos essenciais de tomilho, capim-cidreira e orégano, na dose de 50 mg L<sup>-1</sup>, inibiram o crescimento *in vitro* dos fungos *Botrytis cinerea* e *Alternaria arborescens*. Porém, quando testaram o efeito dos óleos em frutos de tomateiro inoculados com estes fungos, somente os óleos de tomilho e orégano nas doses de 5.000 e 10.000 mg L<sup>-1</sup> reduziram o desenvolvimento da doença (PLOTTO, ROBERTS; ROBERTS, 2003).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito antimicrobiano *in vitro* e *in vivo*, além do efeito sobre a qualidade de maçãs ‘Fuji’, das seguintes substâncias: acibenzolar-S-metil (ASM), extrato cítrico, quitosana, ácido abscísico (ABA), mananoligossacarídeo fosforilado da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* e *Bacillus subtilis* aplicados em macieiras no período de pré-colheita; e de óleos essenciais de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), canela (*Cinnamomum zeylacium* Blume.), citronela (*Cymbopogon winterianus* Jowitt), limão (*Citrus limonium* Risso), tangerina (*Citrus reticulata* Blanco), cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* Linné), eucalipto (*Corymbia citriodora* (Hook.) K.D. Hill e L.A.S. Johnson) e gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe), aplicados em maçãs ‘Fuji’ em pós-colheita.

## 2 USO DE PRODUTOS ALTERNATIVOSEM PRÉ-COLHEITA NA REDUÇÃO DE PODRIDÕES PÓS-COLHEITA EM MAÇÃ ‘FUJI’

### 2.1 RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de produtos alternativos na maturação e qualidade de maçãs ‘Fuji’, e na incidência e severidade pós-colheita de mofo-azul e podridão olho-de-boi. Foram conduzidos três experimentos, dois *in vivo* e um *in vitro*. No experimento 1, os produtos acibenzolar-S-metil (ASM, 30 mg L<sup>-1</sup>, Bion<sup>®</sup>), mananoligossacarídeo fosforilado de *Sacharomyces cerevisiae* (6 mL L<sup>-1</sup>, Agromos<sup>®</sup>), *Bacillus subttillis* (10 mL L<sup>-1</sup>, Serenade<sup>®</sup>), extrato cítrico (2 mL L<sup>-1</sup>, Ecolife<sup>®</sup>), ácido abscísico (ABA, 0,1 mL L<sup>-1</sup>, Protone<sup>®</sup>) e quitosana (10 g L<sup>-1</sup>) foram pulverizados ou não (controle) em pré-colheita em macieiras por duas safras (2013 e 2014). No experimento 2, duas doses dos produtos ASM (60 e 120 mg L<sup>-1</sup>) e mananoligossacarídeo fosforilado de *S. cerevisiae* (1 e 2 mL L<sup>-1</sup>) foram pulverizados ou não (controle) em pré-colheita. Foi avaliada a severidade das lesões (cm) em maçãs inoculadas com *P. expansum* (10<sup>6</sup> esporos mL<sup>-1</sup>) e *C. perennans* (10<sup>4</sup> esporos mL<sup>-1</sup>), na colheita e após o armazenamento refrigerado. A firmeza de polpa, sólidos solúveis, acidez titulável, coloração da epiderme, índice de iodo-amido, incidência de podridões foram avaliados em frutos não inoculados, na colheita e após 5 meses de armazenamento refrigerado (0±0,5 °C/UR 90±2%) mais 7 dias em condições ambiente (22±4 °C/UR 70±5%). No experimento 3, um disco de 0,7 cm de diâmetro de colônia *P. expansum* foi isolado em placas de Petri com meio BDA acrescido dos produtos ASM (30 mg L<sup>-1</sup>), mananoligossacarídeo fosforilado de *Sacharomyces cerevisiae* (6 mL L<sup>-1</sup>), *Bacillus subttillis* (10 mL L<sup>-1</sup>), extrato cítrico (2 mL L<sup>-1</sup>), ABA, (0,1 mL L<sup>-1</sup>), além do controle, e avaliado o diâmetro de colônia. No experimento 1, todos os produtos reduziram a severidade de mofo-azul e olho-de-boi em maçãs ‘Fuji’ inoculadas, exceto ASM (30 mg L<sup>-1</sup>) que não afetou a severidade das doenças em algumas datas de avaliação. No experimento 2, todas as doses dos produtos reduziram a severidade de mofo-azul após o armazenamento. O tratamento com quitosana e *S. cerevisiae* reduziram a incidência de podridões após o armazenamento no primeiro (2013) e segundo ano (2014), respectivamente. Os produtos não afetaram os atributos de maturação e de qualidade, exceto os frutos tratados com ABA, *S. cerevisiae* e *B. subttillis* que apresentaram maior índice de iodo-amido na colheita e menor firmeza de polpa após o armazenamento. No experimento 3, observou-se que ABA e ASM não afetaram o crescimento micelial de *P. expansum*. Portanto, concluiu-se que os produtos alternativos pulverizados em pré-colheita apresentam potencial para o manejo de podridões pós-colheita de maçãs ‘Fuji’.

Palavras-chave: *Malus domestica*. Doenças pós-colheita. Indução de resistência. Fisiologia pós-colheita. *Penicillium expansum*. *Cryptosporiopsis perennans*.

## 2.2 INTRODUÇÃO

As maçãs ‘Fuji’, comparativamente a outras cultivares, como por exemplo maçãs ‘Gala’, são mais susceptíveis ao desenvolvimento de podridões durante armazenagem (VALDEBENITO-SANHUEZA et al., 2006), sendo que os riscos de perdas por podridões aumentam com o atraso na colheita e com o prolongamento da armazenagem, mesmo sob condições de AC, podendo representar valores superiores a 20% do volume armazenado (VALDEBENITO-SANHUEZA; SPOLTI; DEL PONTE, 2010).

O manejo das podridões pós-colheita pode ser realizado por meio do uso de fungicidas em pré ou pós-colheita (VALDEBENITO-SANHUEZA et al., 2010). Todavia, a aplicação de fungicidas em pós-colheita para o manejo de podridões tem sido evitada em maçãs produzidas no Sul do Brasil. Em parte, a não utilização de fungicidas em pós-colheita está ligada ao fato de que o intervalo de carência entre a aplicação dos fungicidas atualmente registrados e a comercialização dos frutos é excessivamente longo (4 a 5 meses, dependendo do produto) (KOVALESKI et al., 2003), o que limita o uso destes. Além disso, entre os fungicidas registrados para uso em pós-colheita de maçãs, até então, não há estudos que mostram efeito positivo sobre o controle do agente causal da podridão olho-de-boi. Adicionalmente, existe uma crescente conscientização e pressão por parte dos consumidores para a redução do uso de agrotóxicos devido aos potenciais efeitos nocivos à saúde humana e ambiental (SHARMA; SINGH; SINGH, 2009) e ao aumento de estirpes de patógenos resistentes a alguns fungicidas (HOLMES; ECKERT, 1999).

O desenvolvimento de uma ferramenta adicional para a redução das perdas por podridões se faz necessária e os produtos indutores de resistência podem ser uma boa alternativa para o manejo de doenças pós-colheita por apresentarem eficiência na redução da incidência de doenças e baixo impacto ambiental (MÉTRAUX; NAWRATH; GENOUD, 2002).

Os produtos com características indutoras de resistência podem sensibilizar a planta a ativar seus mecanismos de defesa em resposta a um patógeno (CONRATH; PIETERSE; MAUCH-MANI, 2002). Entretanto, a redução de doenças nos frutos também pode ser obtida pela inibição direta da germinação de esporos, alongação do tubo germinativo e crescimento micelial de fungos (LIU et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2014) e lise de células, alteração da permeabilidade de membranas e da pressão osmótica em células bacterianas (LOU et al., 2011). Há ainda a possibilidade de que alguns produtos elicitores de resistência promovam uma melhora na atividade de microrganismos antagonistas, conforme descrito por Ge et al. (2010) em morangos (*Rhodotorula glutinis* antagonista a *Botrytis cinerea*) e Lu et al. (2014) em maçãs (*Rhodosporidium paludigenum* antagonista a *Penicillium expansum*). Porém, muitos destes autores têm sugerido que exista uma ação sinérgica dos modos de ação direto, sobre o patógeno, e indireto, ativando as respostas de defesa das plantas e aumentando a atividade dos microrganismos antagonistas (BÉCOT et al., 2000; GE et al., 2010; LU et al., 2014).

Diversos trabalhos têm relatado o efeito de alguns agentes indutores de origem biótica, como *Saccharomyces cerevisiae* Meyen e *Bacillus subtilis* (Ehrenberg 1835) Cohn 1872, e abiótica, como acibenzolar-S-metil (ASM), quitosana, proteína harpina, extrato cítrico, ácido salicílico, ácido  $\beta$ -amino butírico (BABA), entre outros, na indução de respostas de defesa em diversas espécies vegetais, contra infecções virais, fúngicas e bacterianas (TAVARES et al., 2009; DANNER et al., 2008; COSTA et al., 2010; WAEWTHONGRAK; PISUCHPEN; LEELASUPHAKUL, 2015).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da aplicação pré-colheita de produtos com características de indutores de resistência, como acibenzolar-S-metil (ASM, Bion<sup>®</sup>), mananoligossacarídeo fosforilado da parede celular de *Sacharomyces cerevisiae* (Agromos<sup>®</sup>), extrato cítrico (Ecolife<sup>®</sup>), *Bacillus subtilis* (Serenade<sup>®</sup>) ácido abscísico (ABA, Protone<sup>®</sup>) e quitosana sobre a redução de podridões pós-colheita causadas pelos fungos *Penicillium expansum* (mofo-azul) e

*Cryptosporiopsis perennans* (podridão olho-de-boi), além dos seus efeitos na maturação e qualidade pós-colheita de maçãs ‘Fuji’.

## 2.3 MATERIAL E MÉTODOS

Foram conduzidos três experimentos em que os tratamentos consistiram na aplicação de produtos com potencial efeito indutor de resistência. Em dois experimentos avaliou-se o efeito dos produtos aplicados em macieiras ‘Fuji’ a campo, e no terceiro avaliou-se o efeito destes adicionados em meio de cultura sobre o crescimento micelial *in vitro* de *P. expansum*. Os experimentos a campo foram conduzidos em um pomar comercial de maçãs ‘Fuji Kiku’ implantado em 2003, sobre porta-enxerto M-9, com densidade de 3.175 plantas por hectare e produtividade média de 46.400 kg por hectare no município de Vacaria/RS. Toda a área experimental seguiu as práticas de rotina realizado no restante do pomar segundo o sistema de produção integrada de maçãs.

No primeiro experimento, as macieiras foram pulverizadas em duas safras (2013 e 2014) com acibenzolar-S-metil [ASM, 30 mg de ingrediente ativo (i.a.) L<sup>-1</sup>] (Bion<sup>®</sup> 500WG), quitosana (10 g de i.a. L<sup>-1</sup>), extrato cítrico [Ecolife<sup>®</sup>, 2 mL de produto comercial (p.c.) L<sup>-1</sup>], ácido abscísico (0,1 mL de i.a. L<sup>-1</sup>) (Protone<sup>®</sup> SG), mananoligossacarídeo fosforilado da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* (AgroMos<sup>®</sup>, 6 mL de p.c. L<sup>-1</sup>) e *Bacillus subtilis* (Serenade<sup>®</sup>, 10 mL de p.c. L<sup>-1</sup>), além do tratamento controle (plantas sem tratamento com produtos alternativos).

No segundo experimento as macieiras foram pulverizadas na safra 2014 com duas doses de mananoligossacarídeo fosforilado da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* (AgroMos<sup>®</sup>; 1 e 2 mL L<sup>-1</sup>) e acibenzolar-S-metil (ASM; 60 e 120 mg L<sup>-1</sup>) (Bion<sup>®</sup> 500WG Syngenta, Basel, Suíça), além do tratamento controle (plantas sem tratamento com produtos alternativos).

Em ambos os experimento, os produtos foram dissolvidos com a adição de espalhante adesivo (0,05% v/v, Break Thru<sup>®</sup>) e o tratamento controle consistiu da pulverização de água mais espalhante adesivo. A quitosana foi dissolvida em uma solução com 1% de ácido acético e, então, adicionado o espalhante adesivo. Foi utilizado volume de calda de 1.000 L ha<sup>-1</sup>, procurando atingir o completo molhamento foliar da planta. Foram realizadas quatro pulverizações, uma por semana, iniciando cinco semanas antes da colheita comercial. Uma semana após a última pulverização foi realizada a colheita dos frutos.

O delineamento experimental utilizado foi de blocos ao acaso, com quatro blocos por tratamento, sendo cada bloco constituído por cinco plantas. As cinco plantas de cada tratamento em cada bloco foram pulverizadas com o respectivo tratamento. Contudo, apenas as três plantas centrais da parcela foram utilizadas, das quais os frutos foram colhidos na região mediana.

Foram separados 20 frutos de cada bloco para as análises de maturação, 60 frutos para a inoculação com os fungos e 50 frutos foram armazenados sob refrigeração (0±0,5°C/UR 90±2%) por 150 dias para a análise de qualidade após armazenagem.

Os frutos destinados à inoculação foram perfurados na região central em dois lados opostos com auxílio de um texturômetro eletrônico TAXT-Plus<sup>®</sup> (Stable Micro Systems Ltd, Surrey, Reino Unido) equipado com ponteira de 2 mm de diâmetro e programado para perfurar 4 mm de profundidade e, então, foram inoculados com 10 µL de uma suspensão de 10<sup>6</sup> esporos por mL do fungo *Penicillium expansum* (mofo-azul) ou 10<sup>4</sup> esporos por mL do fungo *Cryptosporiopsis perennans* (podridão olho-de-boi) (experimento 1, safra 2). A suspensão de esporos foi preparada com água destilada esterilizada e 0,05% de Tween 20. Foi realizada a contagem do número de esporos com auxílio de uma câmara de Neubauer (hemacitômetro). Vinte frutos inoculados com *P. expansum* por repetição, em cada tratamento, foram mantidos em temperatura ambiente (22±4 °C, UR 70±5%) por até 16 dias, e outros vinte frutos inoculados foram armazenados sob refrigeração (0±0,5 °C, UR 90±2%) por 60 dias. Os frutos inoculados com *C. perennans* foram armazenados sob refrigeração (0±0,5 °C, UR 90±2%) por 90 dias (experimento 1, safra 2).

Com auxílio de uma régua milimetrada avaliou-se o diâmetro das lesões de mofo-azul e podridão olho-de-boi em ambos os experimentos. No experimento 1, as avaliações iniciaram aos 3 dias após a inoculação em ambas as safras (2013 e 2014) e finalizaram aos 16 dias e 13 dias após a



inoculação nas safras 1 (2013) e 2 (2014), respectivamente. Após o armazenamento refrigerado dos frutos, o diâmetro de lesão foi avaliado da mesma forma, aos 0 e 3 dias após o armazenamento refrigerado, nos frutos inoculados com *P. expansum*, e aos 0 e 7 dias após o armazenamento para aqueles inoculados com *C. perennans*. No experimento 2, os frutos foram avaliados aos 4 e 9 dias após a inoculação. Após o armazenamento refrigerado, a avaliação foi realizada aos 0 e 3 dias. A inibição do crescimento de lesão (IC, %) foi calculada para a primeira e última data de avaliação, de acordo com a seguinte fórmula:

$$IC (\%) = [(Dc - Dt) / Dc] * 100 \quad [1]$$

Onde: Dc (cm) é o diâmetro de colônia do tratamento controle; e Dt (cm) é o diâmetro de colônia nos tratamentos com produtos alternativos. Durante as avaliações os frutos permaneceram em condição ambiente (22±4°C, UR 70±5%) em ambos os experimentos.

Os frutos não inoculados nos experimentos 1 e 2 foram avaliados em relação a firmeza de polpa, sólidos solúveis (SS), acidez titulável (AT), cor da epiderme, índice de iodo-amido, *russeting*, incidência de podridões pós-colheita. As avaliações foram realizadas 1 dia após a colheita e após 5 meses de armazenamento refrigerado mais 7 dias a temperatura ambiente (22±4°C, UR 70±5%).

A firmeza de polpa (N) foi determinada na região equatorial dos frutos, em dois lados opostos, após remoção de uma pequena porção da epiderme, com o auxílio de um penetrômetro eletrônico (GÜSS Manufacturing Ltd, Cidade do Cabo, África do Sul) equipado com ponteira de 11 mm de diâmetro.

Os valores de AT (% málico) foram obtidos através de uma amostra de 5 mL de suco, obtido pelo processamento dos frutos em uma centrífuga. Essa amostra foi diluída em 45 mL de água destilada e titulada com solução de NaOH 0,1N até pH 8,1. Para titulação das amostras foi utilizado um titulador automático TitroLine® Easy da SCHOTT Instruments (Mainz, Alemanha). Os teores de SS (°Brix) foram determinados em um refratômetro digital modelo PR201α (Atago®, Tóquio, Japão).

A determinação da cor da epiderme foi efetuada com um colorímetro Minolta (Konica Minolta®, Tóquio, Japão), modelo CR 400, sendo as leituras realizadas na região equatorial em duas regiões do fruto (nas regiões mais e menos expostas à radiação, correspondendo às regiões mais e menos vermelhas, respectivamente), e os resultados expressos nos atributos *L*, *C* e *h*°. O *h*° (ângulo *hue*) define a coloração básica, sendo que 0°-vermelho, 90°- amarelo e 180°- verde. O *L* (lightness) define a luminosidade, que varia de zero (preto) a 100 (branco). O *C* define a cromaticidade (quanto maior, mais intensa é a definição de cor).

O índice de iodo-amido foi determinado pela reação do amido contido no fruto com uma solução de iodo. Após um corte na região equatorial dos frutos, foi aplicada a solução de iodo na superfície cortada da metade peduncular do fruto, a qual foi comparada (reação do iodo com o amido) com uma escala de 1 (seção transversal da polpa corada com iodo, indicando alto teor de amido) a 9 (seção transversal da polpa não corada com iodo, indicando baixo teor de amido).

A presença de *russeting* (cm<sup>2</sup>) nos frutos foi estimada pela medição da área próxima ao pedúnculo a qual apresentava o distúrbio.

A incidência de podridão carpelar (%) foi determinada pelo número de frutos com presença de sintoma de podridão no carpelo em relação ao total de frutos analisados.

O índice de cor vermelha (%) foi estimado visualmente considerando a percentagem de área coberta com coloração vermelha relativa a superfície total dos frutos.

A incidência de podridões (%) naturais foi realizada um dia após o armazenamento refrigerado através da contagem do número de frutos podres em relação ao total de frutos, e identificado o microrganismo causador pela observação dos sintomas.

No experimento 3, foi avaliado o efeito de acibenzolar-S-metil (ASM, 30 mg de i.a. L<sup>-1</sup>) (Bion® 500WG), extrato cítrico (Ecolife®, 2 mL de p.c. L<sup>-1</sup>), ácido abscísico (0,1 mL de i.a. L<sup>-1</sup>) (Protone® SG), mananoligossacarídeo fosforilado de *Saccharomyces cerevisiae* (AgroMos®, 6 mL de p.c. L<sup>-1</sup>) e *Bacillus subtilis* (Serenade®, 10 mL de p.c. L<sup>-1</sup>) sobre o crescimento micelial de *P. expansum* *in vitro*. Os produtos foram adicionados em meio de cultura batata dextrose ágar (BDA) e estes nas placas de Petri. Em cada placa de Petri foi inserido sobre o meio um disco de 0,7 cm de diâmetro com o fungo *P. expansum* proveniente de colônias com 10 dias de crescimento. Um tratamento controle foi utilizado inserindo um disco com o fungo em meio BDA. As placas de Petri

foram acondicionadas em B.O.D a 23° C e fotoperíodo de 12 horas. Foram utilizadas 10 placas para cada tratamento, cada placa de Petri representava uma repetição, seguindo um delineamento experimental inteiramente casualizado. Após 3 e 7 dias de crescimento do fungo foi avaliado o diâmetro de colônia (cm) com o auxílio de uma régua milimetrada.

Os dados obtidos foram analisados utilizando o programa SAS (SAS Institute, Inc., Cary, NC) e submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). No experimento 1, os dados de diâmetro de lesão em função dos dias após a inoculação foram submetidos a análise de regressão. Adicionalmente, as diferenças entre o coeficiente angular das retas (b), entre tratamentos do experimento 1, foram determinadas por meio do teste t. Os dados em porcentagem foram transformados através da equação arco seno  $(y/100)^{1/2}$ .

## 2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.4.1 Efeito dos produtos alternativos nas podridões pós-colheita: frutos inoculados

#### *Avaliações na colheita:*

No experimento 1, em ambos os anos de avaliação, aos 3 dias após a inoculação, pode-se observar que frutos controle apresentaram maior diâmetro de lesão de mofo-azul, porém no segundo ano de avaliação (2014) não diferiram dos frutos tratados em pré-colheita com *B. subtilis* e ABA (Tabelas 1 e 2). No primeiro ano (2013), todos os tratamentos apresentaram frutos com menor diâmetro de lesão do que em frutos das plantas controle até 16 dias após a inoculação, com exceção dos frutos tratados com ASM, os quais não diferiram do controle aos 16 dias após a inoculação (Tabela 1). No primeiro ano (2013), frutos tratados com ABA e quitosana apresentaram menor diâmetro de mofo-azul aos 3 dias após a inoculação, observando-se uma inibição de crescimento maior que 44%, entretanto, aos 16 dias após a inoculação a inibição de crescimento reduziu para 5,3 e 7,7, respectivamente (Tabela 1). Os demais tratamentos induziram uma inibição de crescimento de 18,4 a 29,3% aos 3 dias após a inoculação, entretanto, também se observou redução nestes valores na avaliação realizada aos 16 dias após a inoculação, com valores entre 4,4 e 8% sendo estas maiores que a inibição de 0% no tratamento controle, com exceção dos frutos tratados com ASM, em que houve uma leve indução de crescimento de lesão (0,2%) (Tabela 1).

No segundo ano (2014), aos 3 dias após a inoculação, observou-se eficiência no controle de mofo-azul nos frutos tratados com *S. cerevisiae*, quitosana, ASM e extrato cítrico, com inibição de crescimento de 17,8; 10,1; 10,1 e 10,5%, respectivamente. (Tabela 2). Entretanto, ao final das avaliações, apenas o tratamento com *S. cerevisiae* manteve menor diâmetro de lesão de mofo-azul em maçãs ‘Fuji Kiku’, com 10,9% de inibição do crescimento de lesão (Tabela 2). Vários autores relatam redução na ocorrência de doenças com o tratamento das plantas com quitosana, *S. cerevisiae* ou ASM em diversas culturas, como feijão, morango, melão e mamão, e atribuem esse efeito ao aumento da atividade de enzimas relacionadas à patogênese, como fenilalanina amônia-liase (PAL), peroxidase,  $\beta$ -1,3-glucanase e quitinase (DANTAS et. al., 2004; MAZARO et. al., 2008; ZHANG; LI; LIU, 2011). Entretanto, no presente trabalho (experimento 1) não se observou efeito de ASM no controle de mofo-azul em maçãs ‘Fuji’ na maioria das datas de avaliação no primeiro ano (2013). Soares, Maringoni e Lima (2004) também não observaram redução de murcha-de-Curtobacterium em feijoeiros tratados com ASM. Todavia, diversos trabalhos vêm descrevendo efeito positivo do tratamento com ASM em diversos patossistemas. Iriti, Mapelli e Faoro (2007) observaram uma redução de 71% do tamanho de micélio de *Botrytis cinerea* em tomates tratados com ASM (0,3 mM) e inoculados com o fungo em pós-colheita, além do aumento de 15,7% no conteúdo de licopeno em relação a frutos não tratados. Outros autores relatam que a pulverização pré-colheita de batatas com ASM (50 mg L<sup>-1</sup>) reduziu a incidência de doenças foliares (*Alternaria solani* e *Erysiphe cichoracearum*) a campo e em casa de vegetação (BOKSHI; MORRIS; DEVERALL, 2003). ASM (100 mg L<sup>-1</sup>) também reduziu a severidade de doença nos tubérculos inoculados após a colheita (*Fusarium semitectum*), promovendo um aumento na atividade da enzima  $\beta$ -1,3-glucanase em folhas, caule, tubérculos, estolões, mas não em raízes, até 45 dias após a colheita (BOKSHI; MORRIS;

DEVERALL, 2003). Cao e Jiang (2006) relatam que pulverizações (2 vezes) em pré-colheita de peras ‘Yali’ com ASM (75 mg L<sup>-1</sup>) podem reduzir a ocorrência de doenças em pós-colheita (*Penicillium expansum* e *Alternaria alternata*) em até 42,7%. Os autores observaram que frutos maduros provenientes de plantas tratadas com ASM (75 mg L<sup>-1</sup>) apresentam um aumento na atividade de enzimas de defesa, como fenilalanina amônia-liase, β-1,3 glucanase e quitinase, quando comparados com frutos de plantas não tratadas. Este aumento também foi observado em frutos jovens após a primeira pulverização com ASM, além da maior atividade de peroxidase, polifenoloxidase e aumento no nível de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Tabela 1 - Diâmetro de lesão (cm) em maçãs ‘Fuji’ tratadas em pré-colheita com diferentes produtos alternativos e inibição do crescimento (IC, %) de mofo-azul em maçãs inoculadas 2 dias após a colheita com o fungo *Penicillium expansum*. Os frutos foram mantidos a 22±4°C e umidade relativa de 70±5%. Safra 2013.

Tratamento	Dias após a inoculação			
	3		16	
	Diâmetro de lesão		IC	
Controle	0,71 a	4,32 a	0,0	0,0
ASM (30 mg L <sup>-1</sup> )	0,56 b	4,33 a	20,8	-0,2
<i>S. cerevisiae</i> (6 mL L <sup>-1</sup> )	0,50 c	3,97 b	29,3	8,0
Extr. cítrico (2 mL L <sup>-1</sup> )	0,58 b	4,13 b	18,4	4,4
<i>B. subtilis</i> (10 mL L <sup>-1</sup> )	0,51 c	4,08 b	27,7	5,5
ABA (0,1 mL L <sup>-1</sup> )	0,38 d	4,09 b	46,7	5,3
Quitosana (10 g L <sup>-1</sup> )	0,39 d	3,99 b	44,5	7,7
Média	0,52	4,13	26,8	4,4
Desvio padrão	0,24	0,67	16,0	3,3

Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05). Fonte: produção do próprio autor, 2016.

Tabela 2 - Diâmetro de lesão (cm) em maçãs ‘Fuji’ tratados em pré-colheita com diferentes produtos alternativos e inibição do crescimento (IC, %) de frutos inoculados com o fungo *Penicillium expansum*. Os frutos foram mantidos a 22°C ±4°C e umidade relativa de 70±5%. Safra 2014.

Tratamento	Dias após a inoculação			
	3		13	
	Diâmetro de lesão		IC	
Controle	0,78 a	6,30 a	0,0	0,0
ASM (30 mg L <sup>-1</sup> )	0,70 bc	6,17 ab	10,1	2,1
<i>S. cerevisiae</i> (6 mL L <sup>-1</sup> )	0,64 c	5,61 b	17,8	10,9
Extr. cítrico (2 mL L <sup>-1</sup> )	0,70 bc	6,03 ab	10,5	4,3
<i>B. subtilis</i> (10 mL L <sup>-1</sup> )	0,72 ab	5,81 ab	8,1	7,7
ABA (0,1 mL L <sup>-1</sup> )	0,75 ab	6,16 ab	3,4	2,2
Quitosana (10 g L <sup>-1</sup> )	0,70 bc	6,07 ab	10,1	3,6
Média	0,71	6,02	8,8	4,4
Desvio padrão	0,14	1,03	5,7	3,7

Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05). Fonte: produção do próprio autor, 2016.

Possivelmente, diversos fatores influenciaram na ausência de efeito positivo no controle de *P. expansum* em maçãs ‘Fuji’ devido o tratamento de ASM neste trabalho, como o possível aumento da atividade de enzimas, as quais não tenham efeito sobre *P. expansum*, como observado por Soares, Maringoni e Lima (2004) em feijoeiro. Entretanto, pode não ter ocorrido indução de resistência devido a baixa concentração do produto, como observado por Siegrist et al. (1997). Por este motivo,

no segundo ano dos experimentos (2014) optou-se por testar doses maiores de ASM (60 e 120 mg L<sup>-1</sup>). Mesmo com resultados consistentes do efeito de *S. cerevisiae* neste experimento, optou-se por testar uma dose mais baixa, devido a dose recomendada para diversas culturas ser 1 a 2 mL L<sup>-1</sup>.

Através da análise de regressão pode-se observar que em todos os tratamentos o diâmetro de lesão causada por *P. expansum* cresceu linearmente, em ambos os anos de avaliação (Tabela 3). Ou seja, conforme aumentou o número de dias que os frutos permanecem em temperatura ambiente maior o crescimento de *P. expansum*, independente do tratamento. Através da análise da significância do coeficiente angular da reta (*b*) percebe-se que as retas que estimam o crescimento do fungo têm a mesma inclinação em todos os tratamentos (diferença entre *b* não significativa,  $p < 0,05$ ). Entretanto, analisando o efeito de tratamento em cada data de avaliação, o diâmetro de lesão foi inferior ( $p < 0,05$ ) em alguns tratamentos, na maioria dos dias avaliados, podendo considerar que esse efeito de redução do tamanho de podridão ocorreu, possivelmente, no início do estabelecimento do fungo no fruto (Tabelas 1 e 2). A taxa de crescimento diário de *P. expansum* variou de 0,26 a 0,28 cm por dia na safra 2013 e 0,49 a 0,54 cm por dia na safra 2014. Variações na incidência de doenças, bem como, em atributos de maturação e qualidade de frutos podem ocorrer entre anos devido a uma série de fatores, dentre eles precipitação, radiação solar e pressão de inóculo (KRETZSCHMAR et al., 2007; CORRÊA et al., 2010).

Tabela 3 - Modelos lineares para diâmetro de lesão de *Penicillium expansum* inoculado em maçãs 'Fuji', em função dos dias após a inoculação, para cada tratamento com produtos alternativos.

Tratamento	Modelos lineares		
	Significância	<i>a</i>	<i>b</i>
Safrá 2013			
Controle	** <sup>1</sup>	-0,29148	0,27805 <sup>2</sup> ns
ASM (30 mg L <sup>-1</sup> )	**	-0,44311	0,28844
<i>S. cerevisiae</i> (6 mL L <sup>-1</sup> )	**	-0,40609	0,26226
Extrato cítrico (2 mL L <sup>-1</sup> )	**	-0,36985	0,26986
<i>B. subtilis</i> (10 mL L <sup>-1</sup> )	**	-0,41911	0,27163
ABA (0,1 mL L <sup>-1</sup> )	**	-0,55124	0,27889
Quitosana (10 g L <sup>-1</sup> )	**	-0,45472	0,27013
Safrá 2014			
Controle	** <sup>1</sup>	-0,85788	0,5458 <sup>2</sup> ns
ASM (30 mg L <sup>-1</sup> )	**	-0,79995	0,5432
<i>S. cerevisiae</i> (6 mL L <sup>-1</sup> )	**	-0,82359	0,4988
Extrato cítrico (2 mL L <sup>-1</sup> )	**	-0,83160	0,5317
<i>B. subtilis</i> (10 mL L <sup>-1</sup> )	**	-0,69939	0,5132
ABA (0,1 mL L <sup>-1</sup> )	**	-0,84497	0,5373
Quitosana (10 g L <sup>-1</sup> )	**	-0,75294	0,5299

<sup>1</sup> Significância do modelo linear (\*\* significativo  $p < 0,01$ )

<sup>2</sup> Significância da diferença entre coeficientes angulares das retas entre tratamentos, determinado pelo teste t

*a* = intercepto

*b* = coeficiente angular da reta

ns = não significativo ( $p < 0,05$ )

Fonte: produção do próprio autor, 2016.

Vallad e Goodman (2004) demonstraram que o tempo de duração dos compostos formados em decorrência da indução de resistência é variável e pode ter curta duração. Ainda, de acordo com esses autores, o tempo requerido para a estabilização da indução de resistência é dependente do tipo de elicitor e da espécie vegetal, e qualquer interrupção que faça com que a planta paralise o acúmulo de ácido salicílico ou ácido jasmônico resulta em perda da expressão de genes relacionados à patogênese.

Diversos autores relatam melhora no mecanismo molecular de defesa contra fungos patogênicos após o tratamento com produtos elicitores de resistência. Zhang et al. (2015) observaram que a aplicação de 0,2% de quitosana promove a expressão dos genes MPK3, MPK6, PR1 e PR5 na epiderme de tomates cereja. Estes genes estão relacionados ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio e ácido salicílico, os quais melhoram a atividade das principais enzimas relacionadas a patogênese, incluindo fenilalanina amônia-liase, peroxidase, quitinase e  $\beta$  1,3-quitinase e, consequentemente, melhora na resistência a microrganismos patogênicos (DURRANT; DONG, 2004; CAO et al., 2013).

Gouvea et al. (2009) observaram redução da incidência de diversas doenças em morangueiro, como, mancha-de-dendrofoma (*Dendrophoma obscurans*), flor-preta (*Colletotrichum acutatum*) e mofo-cinza (*Botrytis cinerea*) devido a aplicação em pré-colheita de diferentes preparações da levedura *S. cerevisiae*. Os autores verificaram um aumento da atividade de enzimas quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanases até 72 e 120 horas, respectivamente, após o tratamento das plantas com a levedura. Entretanto, como o tratamento com *S. cerevisiae* reduziu a incidência de *B. cinerea* nos frutos (avaliados 8 dias após o tratamento), os autores consideram que a levedura pode atuar por diferentes mecanismos neste patossistema, possivelmente algum metabólito ou complexo de metabólitos produzidos por *S. cerevisiae* pode ter atuado diretamente sobre o patógeno.

No experimento 2, os frutos tratados em pré-colheita com as menores doses de *Sacharomyces cerevisiae* (1 mL L<sup>-1</sup>) e ASM (60 mg L<sup>-1</sup>) e mantidos em temperatura ambiente (22±4°C, UR 70±5%) apresentaram o menor diâmetro de lesão de mofo-azul na avaliação realizada aos 4 dias após a inoculação, com uma inibição de crescimento de 7,2 e 4,6%, respectivamente (Tabela 4). Ao final das avaliações (9 dias após a inoculação), os frutos sem tratamento com substâncias alternativas em pré-colheita (controle) e frutos tratados com a maior dose de ASM (120 mg L<sup>-1</sup>) e de *Sacharomyces cerevisiae* (2 mL L<sup>-1</sup>) apresentaram o maior diâmetro de lesão, observando-se uma leve indução de crescimento de 4,3 e 1,6%, com o tratamento com ASM e *S. cerevisiae*, respectivamente (Tabela 4). Portanto, observamos que, nos frutos mantidos em temperatura ambiente, o tratamento em pré-colheita com as menores doses de *S. cerevisiae* e ASM (1 mL L<sup>-1</sup> e 60 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente) apresentaram a maior eficiência de controle do mofo-azul nas datas de avaliação (Tabela 4). Dantas et al. (2004) observaram um aumento da incidência de podridões pós-colheita em mamões após pulverizações sequenciais em pré-colheita com 100 mg L<sup>-1</sup> de ASM, enquanto que *S. cerevisiae* na dose de 5 mL L<sup>-1</sup> foi eficiente no controle de doenças pós-colheita de mamão. Costa et al. (2010) observaram que a pulverização com mananoligossacarídeo fosforilado de *S. cerevisiae* reduziu a incidência de vassoura-de-bruxa em mudas de cacaueteiro 60 dias após a inoculação com *Moniliophthora perniciosa*, entretanto, a pulverização das mudas com ASM, 7 ou 15 dias antes da inoculação, não reduziu a incidência da doença. Os autores assumem que a ineficiência do ASM está associada a alta pressão do inóculo, uma vez que, tanto ASM quanto *S. cerevisiae* aumentaram a atividade das enzimas quitinase,  $\beta$ -1,3-glucanase, peroxidase de guaiacol e oxidases de polifenóis, porém, afirmam que o efeito do *S. cerevisiae* a longo período de tempo é devido a presença de cobre em sua composição, o qual promove um efeito inibitório do fungo (COSTA et al., 2010).

Alguns autores citam que a eficiência na redução da incidência ou da severidade de doenças em plantas é variável com o número de aplicações e a dose utilizada para os diferentes produtos elicitores (HEIL, 2001; DANTAS et al., 2004; BARBOSA; LARANJEIRA; COELHO, 2008; COSTA et al., 2010). Pascholati e Leite (1995) também relataram que a proteção induzida é dependente do intervalo de tempo entre o tratamento com o indutor e o subsequente contato da planta com o patógeno (natural ou por inoculação artificial). Dantas et al. (2004) observaram que o aumento no número de aplicações de ASM (50 e 100 mg L<sup>-1</sup>) reduziu a eficiência do produto no controle de doenças em mamoeiro, entretanto, o oposto ocorreu para pulverizações com *S. cerevisiae* (5 e 7,5 mL L<sup>-1</sup>). Os autores atribuem esse fato ao maior custo energético para planta em consequência do processo de indução de resistência devido as pulverizações com ASM e consideraram que o efeito de *S. cerevisiae* não foi apenas indutor de resistência na planta, mas também inibitório do fungo. Barbosa, Laranjeira e Coelho (2008) observaram redução da altura de planta e da biomassa de parte aérea em algodão tratado com ASM (100 mg L<sup>-1</sup>), enquanto que estes atributos não foram afetados pela aplicação de *S. cerevisiae* (2 mL L<sup>-1</sup>). Entretanto, quando avaliaram a atividade da enzima

peroxidase, esta foi maior nas plantas pulverizadas com ASM, porém, a atividade da peroxidase e polifenoloxidase em plantas tratadas com *S. cerevisiae* foi menor até mesmo quando comparadas a plantas controle. Portanto, os autores consideram que a indução de resistência pode ter um custo energético para as plantas e, até mesmo, torná-la mais suscetível a microrganismos patogênicos quando usada em doses e número de aplicações incorretas (BARBOSA; LARANJEIRA; COELHO, 2008).

Tabela 4 - Diâmetro de lesão (cm) em maçãs ‘Fuji Kiku’ tratadas em pré-colheita com acibenzolar-S-metil (ASM) e *Sacharomyces cerevisiae* em duas doses mais o controle (frutos colhidos de plantas não tratadas com produtos alternativos) e inibição do crescimento de mofo-azul (IC, %) em frutos inoculados na colheita com o fungo *Penicillium expansum*. Os frutos foram mantidos a uma temperatura de 22±4°C e uma umidade relativa de 70±5% por 9 dias.

Tratamento	Dias após a inoculação			
	4		9	
	Diâmetro de lesão		IC	
Controle	1,29 a	4,01 a	0,0	0,0
ASM 60 mg L <sup>-1</sup>	1,23 b	3,96 b	4,6	1,3
ASM 120 mg L <sup>-1</sup>	1,28 a	4,18 a	1,1	-4,3
<i>S. cerevisiae</i> 1 mL L <sup>-1</sup>	1,20 b	3,96 b	7,2	1,3
<i>S. cerevisiae</i> 2 mL L <sup>-1</sup>	1,25 ab	4,07 a	3,1	-1,6
Média	1,25	4,03	3,2	-0,6
Desvio padrão	0,16	0,34	2,9	2,4

Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05). Fonte: produção do próprio autor, 2016.

#### **Avaliações após o armazenamento refrigerado**

No experimento 1, podemos observar que todos os tratamentos apresentaram efeito inibitório do crescimento de *P. expansum* (mofo-azul) e *C. perennans* (olho-de-boi) em todas as datas de avaliação, exceto os frutos tratados com ASM, que não diferiram de frutos controle no diâmetro de lesão de mofo-azul (Tabela 5). O tratamento com *B. subtilis* demonstrou eficiência na redução de crescimento dos fungos avaliados, tanto nas avaliações realizadas logo após a colheita na primeira safra (2013) (Tabela 1) quanto após o armazenamento refrigerado dos frutos (Tabela 5) apresentando o menor tamanho de lesão de mofo-azul e olho-de-boi em todas as datas avaliadas após o armazenamento. Entretanto, não apresentou diferença no diâmetro de lesão em relação aos frutos tratados com *S. cerevisiae* (para *C. perennans*) ou *S. cerevisiae*, ABA e quitosana (para *P. expansum*) (Tabela 5). Os frutos tratados com ASM apresentaram uma inibição de crescimento de mofo-azul de apenas 2,9 e 4% nas avaliações realizada aos 0 e 3 dias após a saída da câmara, respectivamente, não diferindo da inibição de 0% no tratamento controle (Tabela 5). Nos demais tratamentos a inibição de crescimento de mofo-azul variou de 11,1 a 17,5% e 6,1 a 12,1% aos 0 e 3 dias após a saída da câmara, respectivamente (Tabela 5). A inibição de crescimento de olho-de-boi variou de 16 a 33,6% e 9 a 17,3% aos 0 e 7 dias após a saída da câmara, respectivamente, sendo a maior inibição de crescimento observada nos frutos tratados com *B. subtilis* (33,6%) e mananoligossacarídeo fosforilado de *S. cerevisiae* (30,3%) na saída da refrigeração (Tabela 5).

A eficiência de diversas espécies de *Bacillus* vem sendo relatada em inúmeros trabalhos. Muitas espécies de *Bacillus* produzem lipopeptídeos, os quais são componentes base de agentes de biocontrole como Serenade® (ONGENA; JACQUES, 2008). Surfactinas (SF), iturinas (IT) e fengicinas (FE) são as três famílias de lipopeptídeos produzidas por *Bacillus*, os quais são amplamente estudados devido suas atividades antagonista em uma ampla gama de fitopatógenos, incluindo bactérias, fungos e oomicetos (ONGENA; JACQUES, 2008). Seus efeitos estão relacionados, principalmente, ao aumento da permeabilidade seletiva das membranas de microorganismos alvos, a qual leva ao extravasamento de líquido celular e a lise da célula (PATEL

et al., 2011; FIEDLER; HEERKLOTZ, 2015). As SF comportam-se como um poderoso surfactante (HEERKLOTZ; SEELIG, 2007), enquanto que IT interagem com SF promovendo um efeito sinérgico na lise de diferentes células, entretanto, quando isolados, não têm um efeito tão evidente (MAGET-DANA et al., 1992). As FE são altamente permeáveis a membranas plasmáticas, promovendo o extravasamento de líquido celular e fusão de lipídeos (FIEDLER; HEERKLOTZ, 2015; PATEL et al., 2011).

Tabela 5 - Diâmetro de lesão (cm) após o armazenamento refrigerado de maçãs ‘Fuji’ tratadas em pré-colheita com diferentes produtos alternativos e inibição de crescimento de mofo-azul ou olho-de-boi (IC, %) em frutos inoculados com o fungo *Penicillium expansum* ou *Cryptosporiopsis perennans*, respectivamente. Os frutos foram mantidos 55 ou 115 dias a  $0\pm 0,5^{\circ}\text{C}$  e umidade relativa de  $95\pm 3\%$  mais 3 ou 7 dias a  $22\pm 4^{\circ}\text{C}$  e umidade relativa de  $70\pm 5\%$ , para *P. expansum* ou *C. perennans*, respectivamente. Safra 2014.

Tratamento	Dias após o armazenamento refrigerado			
	0		3	
	Diâmetro de lesão	IC (%)	Diâmetro de lesão	IC (%)
<i>Penicillium expansum</i>				
Controle	3,77 a	5,05 a	0,0	0,0
ASM (30 mg L <sup>-1</sup> )	3,66 a	4,85 ab	2,9	4,0
<i>S. cerevisiae</i> (6 mL L <sup>-1</sup> )	3,21 bc	4,44 d	14,9	12,1
Extr. cítrico (2 mL L <sup>-1</sup> )	3,35 b	4,74 bc	11,1	6,1
<i>B. subtilis</i> (10 mL L <sup>-1</sup> )	3,11 c	4,48 d	17,5	11,3
ABA (0,1 mL L <sup>-1</sup> )	3,21 bc	4,48 d	14,9	11,3
Quitosana (10 g L <sup>-1</sup> )	3,27 bc	4,54 cd	13,3	10,1
Média	3,24	4,63	10,6	7,8
Desvio Padrão	0,57	0,66	6,6	4,6
<i>Cryptosporiopsis perennans</i>				
	0	7	0	7
Controle	1,19 a	1,33 a	0,0	0,0
ASM (30 mg L <sup>-1</sup> )	1,00 b	1,19 b	16,0	10,5
<i>S. cerevisiae</i> (6 mL L <sup>-1</sup> )	0,83 de	1,10 c	30,3	17,3
Extr. cítrico (2 mL L <sup>-1</sup> )	0,89 cd	1,18 b	25,2	11,3
<i>B. subtilis</i> (10 mL L <sup>-1</sup> )	0,79 e	1,11 c	33,6	16,5
ABA (0,1 mL L <sup>-1</sup> )	0,89 cd	1,20 b	25,2	9,8
Quitosana (10 g L <sup>-1</sup> )	0,92 b	1,21 b	22,7	9,0
Média	0,93	1,18	21,8	10,6
Desvio padrão	0,27	0,40	11,1	5,7

Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Fonte: produção do próprio autor, 2016.

O tratamento com quitosana também demonstrou potencial para a redução do diâmetro de lesão de mofo-azul e olho-de-boi, tanto após o armazenamento refrigerado (Tabela 5) quanto nas avaliações na colheita (Tabelas 1). Zhang, Li e Liu (2011) consideraram que o modo de ação da quitosana ainda não está bem elucidado. Entretanto, propõem que o efeito de quitosana solúvel em ácido pode ser direto sobre o patógeno, inibindo a germinação de esporos e crescimento de hifas de *Botrytis cinerea*, *Fusarium solani*, *Rhizopus stolonifer*, *Penicillium* e *Sclerotium rolfsii*. Todavia, o efeito de quitosana também pode ser em decorrência da indução de resistência, aumentando a

atividade de enzimas relacionadas a patogênese como quitinase e  $\beta$ -1,3-glucanase em laranjas, morangos e framboesas, e de fenilalanina amonialiase (PAL) em morangos e uvas de mesa (ROMANAZZI et al., 2002; ZHANG; LI; LIU, 2011). Outros autores têm relacionado o efeito de quitosana sobre podridões à preservação da integridade da membrana dos frutos e redução da produção da enzima poligalacturonase por fungos (EL GHAOUTH et al., 1997; MAZARO et al., 2008). Além disso, quitosana pode causar dano direto a citologia da hifa de fungos (EL GHAOUTH et al., 1997) e ruptura de membranas plasmáticas de bactérias (LOU et al., 2011), reduzindo a habilidade dos patógenos de penetrar ou colonizar os tecidos hospedeiros. Mazaro et al. (2008) atribuíram a redução de doenças pós-colheita em morangos ‘Aromas’ a uma combinação do efeito direto de quitosana (1%) sobre os fungos e ao aumento de compostos relacionados a defesa, como polifenóis, pelos frutos.

Observou-se que frutos tratados com extrato cítrico (Ecolife<sup>®</sup>) apresentaram menor diâmetro de lesão de olho-de-boi (*C. perennans*), especialmente aos 2 dias após a retirada da refrigeração, onde o tratamento proporcionou o menor tamanho de lesão, não diferindo dos frutos tratados com ABA e quitosana (Tabela 5). O tratamento com extrato cítrico também reduziu o diâmetro de mofo-azul (*P. expansum*) após o armazenamento refrigerado dos frutos (Tabela 5), assim como ocorreu com os frutos avaliados na colheita em todas as datas avaliadas no primeiro ano (2013) (Tabela 1) e aos 3 dias após a inoculação no segundo ano (2014) (Tabela 2). Motoyama et al. (2003) observaram efeito antibacteriano de diferentes doses (1 a 5.000  $\mu\text{L L}^{-1}$ ) de extrato cítrico (Ecolife<sup>®</sup>). O extrato cítrico também afetou o crescimento de *Colletotrichum gloeosporioides*, reduzindo a ocorrência de podridão peduncular em frutos e antracnose em mudas de mamão (NASCIMENTO; NERY; RODRIGUES, 2008), e de *Colletotrichum musa*, reduzindo o número de lesões de antracnose em bananas (FURTADO et al., 2010). Alguns autores consideram que há uma ação sinérgica entre os componentes de Ecolife<sup>®</sup>, promovendo às plantas uma tolerância ao estresse, além de ativar os processos de resistência a doenças e regular o vigor vegetativo ocasionando um melhor direcionamento energético para necessidades reprodutivas nas plantas (FURTADO et al., 2010; KUHN et al., 2006).

No experimento 2, nos frutos inoculados e avaliados após o armazenamento refrigerado ( $0\pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , UR  $90\pm 2\%$ ), o tratamento com os produtos ASM e mananoligossacarídeo fosforilado de *S. cerevisiae*, tanto na maior dose quanto a menor, reduziram o desenvolvimento de *P. expansum* até 3 dias após a retirada da refrigeração, observando-se inibição de crescimento de mofo-azul superior a 6% (Tabela 6).

Tabela 6 - Diâmetro de lesão (cm) em maçãs ‘Fuji’ tratadas em pré-colheita com acibenzolar-S-metil (ASM) e *Sacharomyces cerevisiae* em duas doses mais o controle (frutos colhidos de plantas não tratadas com produtos alternativos) e inibição do crescimento (IC, %) em frutos inoculados com o fungo *Penicillium expansum*. Os frutos foram mantidos por 60 dias a uma temperatura de  $0\pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$  e umidade relativa de  $90\pm 2\%$  mais 3 dias a temperatura ambiente ( $22\pm 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , UR  $70\pm 5\%$ ).

Tratamento	Dias após o armazenamento refrigerado			
	0	3	0	3
	Diâmetro de lesão		IC (%)	
Controle	4,02 a	5,11 a	0,0	0,0
ASM 60 mg L <sup>-1</sup>	3,70 b	4,81 b	8,1	6,0
ASM 120 mg L <sup>-1</sup>	3,72 b	4,80 b	7,5	6,0
<i>S. cerevisiae</i> 1 mL L <sup>-1</sup>	3,70 b	4,81 b	8,1	6,0
<i>S. cerevisiae</i> 2 mL L <sup>-1</sup>	3,67 b	4,81 b	8,6	6,0
Média	3,77	4,87	6,5	4,8
Desvio padrão	0,33	0,36	3,6	2,7

Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Fonte: produção do próprio autor, 2016.



Na avaliação de crescimento realizada no dia de retirada da refrigeração (dia 0), frutos controle apresentavam lesão de pouco mais de 4 cm, enquanto que os frutos tratados com ASM e *S. cerevisiae* as lesões tinham em torno de 3,7 cm, representando inibição de crescimento em torno de 8%. Ao final das avaliações (3 dias após a retirada da refrigeração), a lesão de frutos controle chegava a 5,1 cm e as lesões de frutos tratados eram de aproximadamente 4,8 cm (Tabela 6).

#### 2.4.2 Efeito dos produtos alternativos sobre o crescimento micelial de *Penicillium expansum* *in vitro*:

No experimento 3 (*in vitro*), também se observou efeito de alguns produtos sobre o crescimento micelial de *P. expansum* (Tabela 7). A presença de mananoligossacarídeo fosforilado de *S. cerevisiae*, extrato cítrico ou *B. subtilis* no meio de crescimento de *P. expansum* reduziu o diâmetro de colônia aos 3 e 7 dias após o isolamento e promoveram uma inibição de crescimento de 75,0; 20,5 e 67,5% após 7 dias de incubação, respectivamente (Tabela 7). Entretanto, ASM e ABA não afetaram o crescimento do fungo *in vitro*, porém, apesar de não diferirem do tratamento controle, estimularam o crescimento do fungo em 43,3 e 38,2% após 7 dias de incubação, respectivamente (Tabela 7). Cardoso Filho (2003) observou que *S. cerevisiae* afetou o desenvolvimento *in vitro* de *Guignardia citricarpa*, agente causal da pinta preta em citros, reduzindo a germinação de esporos e formação do apressório pelo fungo. Alguns trabalhos têm demonstrado que a antibiose pode ser um dos mecanismos de ação de *S. cerevisiae* sobre *Hemileia vastatrix* em café (Roveratti, 1989), *Botrytis cinerea* em *Eucalyptus* sp. (Lopes, 2001) e sobre *Exserohilum turcicum* em milho (STANGARLIN; PASCHOALATI, 1994). É importante ressaltar que naqueles trabalhos os autores usaram a levedura viva no tratamento das plantas. Entretanto, Costa et al. (2010) assumem que o efeito inibitório *in vitro* de *S. cerevisiae* na formulação de Agromos<sup>®</sup> (mananoligossacarídeo fosforilado) é devido a presença de sulfato de cobre em sua composição, pois quando estes testaram Agromos<sup>®</sup> comercial e Agromos<sup>®</sup> Experimental (sem Cu<sup>++</sup> em sua composição) observaram que a formulação Experimental induziu o crescimento de *Moniliophthora perniciosa*, provavelmente devido ausência de cobre e grande quantidade de açúcares e aminoácidos em sua composição, enquanto que a formulação comercial apresentou efeito inibitório diretamente proporcional a dose.

Tabela 7 - Diâmetro de colônia (cm) e inibição do crescimento (IC, %) de *Penicillium expansum* em meio de cultura batata dextrose ágar (BDA) com acréscimo de diferentes produtos alternativos.

Tratamento	Dias após a incubação			
	3	7	3	7
	Diâmetro de colônia		IC (%)	
Controle	1,86 a	3,02 a	0,0	0,0
ASM (30 mg L <sup>-1</sup> )	1,61 a	4,33 a	13,7	-43,3
<i>S. cerevisiae</i> (6mL L <sup>-1</sup> )	0,75 c	0,75 c	59,5	75,0
Extrato cítrico (2 mL L <sup>-1</sup> )	1,32 b	2,40 b	29,3	20,5
<i>Bacillus subtilis</i> (10 mL L <sup>-1</sup> )	0,96 bc	0,98 c	48,3	67,5
ABA (0,1 mL L <sup>-1</sup> )	1,74 a	4,17 a	6,8	-38,2
Média	1,37	2,60	26,3	13,6
Desvio padrão	0,71	2,02	23,8	50,6

Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05). Fonte: produção do próprio autor, 2016.

Associando os resultados do experimento *in vitro* com os *in vivo*, podemos atribuir que quando houve redução do tamanho de lesão nos frutos tratados com ABA e ASM, possivelmente, foi devido ao processo de indução de resistência nas plantas, a qual persistiu por um determinado tempo em pós-colheita (Tabelas 1, 2, 4, 5, 7). Entretanto, o efeito de mananoligossacarídeo fosforilado de *S. cerevisiae*, extrato cítrico e *B. subtilis* pode estar associado ao efeito direto sobre o fungo, ou,

possivelmente, um efeito sinérgico de ação direta sobre o patógeno e indutor de resistência no tecido vegetal.

### **2.4.3 Efeito dos produtos alternativos sobre a incidência de podridões após o armazenamento refrigerado de maçãs não inoculadas**

Quando se avaliou a incidência de podridões após 5 meses de armazenamento refrigerado de maçãs não inoculadas, em ambas as safras (2013 e 2014), observamos que o tratamento em pré-colheita interferiu apenas na incidência total de podridões, não apresentando efeito significativo no controle de um patógeno específico (Tabela 8). Na safra 2013, observou-se que os frutos tratados com *B. subtilis* tiveram uma incidência inferior a 6% não diferindo, entretanto, de frutos controle, tratados com ASM ou ABA, os quais apresentaram, respectivamente 8%, 13% e 8% de frutos podres (Tabela 8). Ainda no primeiro ano de avaliações (2013), o índice mais baixo de podridões naturais após o armazenamento foi observado nos frutos tratados com quitosana, os quais tiveram menos de 4% de podridões (Tabela 8). Na safra 2014, observou-se que a menor incidência de podridões ocorreu nos frutos tratados em pré-colheita com mananoligossacarídeo fosforilado de *S. cerevisiae*, com uma incidência de 7,75%, entretanto, esta incidência não diferiu dos frutos tratados com ABA e quitosana, os quais apresentaram pouco mais de 9% de podridões (Tabela 8). As maiores incidências de podridões foram observadas nos frutos tratados com ASM, frutos controle, tratados com extrato cítrico e *B. subtilis*, com valores de 23,25; 17,96; 15,12 e 14,62, respectivamente (Tabela 8). Argenta et al. (2015) observaram elevados índices de podridões na gôndola dos supermercados em maçãs ‘Fuji’ a partir de 4 meses de armazenamento, chegando ao máximo após 10 meses de armazenamento refrigerado, onde os índices variaram de 12 a 20% naquele período. No presente trabalho, observou-se incidência média de podridões de 7,3% e 13,9% em 2013 e 2014, respectivamente. (Tabela 8). Estudos têm demonstrado que as principais doenças que vêm sendo detectada após o armazenamento refrigerado de maçãs são podridão olho-de-boi e mofo-azul, dependendo da região produtora no Brasil (VALDEBENITO-SANHUEZA et al., 2006), assim como observado neste estudo, em que o maior índice de podridão foi pela ocorrência de mofo-azul, seguido de podridão olho-de-boi em ambas as safras (Tabela 8).

Tabela 8 - Incidência de podridões causadas por *Penicillium expansum* (mofo-azul), *Cryptosporiopsis perennans* (olho-de-boi), *Botrytis cinerea* (mofo-cinza) e o somatório de outras podridões, causadas por *Rhizopus* sp., *Alternaria* sp. e *Colletotrichum gloeosporioides* em maçãs ‘Fuji’ após 5 meses de armazenamento refrigerado (0±0,5 °C UR 90±2%). Safras 2013 e 2014.

Tratamento	Doenças pós-colheita (%)				Total (%)
	Mofo-azul	Olho-de-boi	Mofo-cinza	Outras	
Saфра 2013					
Controle	5,30 <sup>ns</sup>	0,90 <sup>ns</sup>	0,25 <sup>ns</sup>	1,48 <sup>ns</sup>	8,00 A
ASM (30 mg L <sup>-1</sup> )	7,78	2,65	0,95	1,64	13,02 A
<i>S. cerevisiae</i> (6 mL L <sup>-1</sup> )	4,05	1,70	0,25	1,21	7,21 AB
Extr. cítrico (2 mL L <sup>-1</sup> )	3,53	1,80	0,25	0,25	6,08 AB
<i>B. subtilis</i> (10 mL L <sup>-1</sup> )	3,78	0,70	0,25	0,48	5,21 AB
ABA (0,1 mL L <sup>-1</sup> )	4,93	1,95	0,00	1,20	8,08 A
Quitosana (10 g L <sup>-1</sup> )	2,08	0,45	0,78	0,28	3,59 B
Média	4,49 a	1,45 b	0,39 c	0,93 c	7,30
Desvio padrão	3,12	1,30	0,62	0,58	4,59
Saфра 2014					
Controle	10,24 <sup>ns</sup>	3,49 <sup>ns</sup>	1,73 <sup>ns</sup>	2,51 <sup>ns</sup>	17,96 A
ASM (30 mg L <sup>-1</sup> )	14,97	5,81	0,00	2,47	23,25 A
<i>S. cerevisiae</i> (6 mL L <sup>-1</sup> )	4,71	3,04	0,00	0,00	7,75 B
Extr. cítrico (2 mL L <sup>-1</sup> )	8,00	4,41	0,89	1,82	15,12 A
<i>B. subtilis</i> (10 mL L <sup>-1</sup> )	6,90	4,35	0,00	3,37	14,62 A
ABA (0,1 mL L <sup>-1</sup> )	6,52	2,50	0,00	0,00	9,02 AB
Quitosana (10 mL L <sup>-1</sup> )	7,69	1,67	0,00	0,00	9,35 AB
Média	8,43 a	3,61 b	0,37 c	1,45 bc	13,87
Desvio padrão	6,02	3,57	1,08	1,89	8,83

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha, em cada safra, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05). <sup>ns</sup> = não significativo (p<0,05). Fonte: produção do próprio autor, 2016.

#### 2.4.4 Atributos de maturação na colheita e qualidade após o armazenamento refrigerado dos frutos

No experimento 1, a firmeza de polpa dos frutos variou de 64,8 a 66N, a acidez titulável variou de 0,301 a 0,357% e o teor de sólidos solúveis variou de 13,5 a 14,4 °Brix. Porém, os frutos não apresentaram diferenças entre tratamentos nestes atributos, em ambos os anos de avaliação (Tabela 9). Antonioli et al. (2011) também não observaram diferença significativa no conteúdo de SS, AT e pH em pós-colheita de framboesas ‘Heritage’ tratadas em pré-colheita com quitosana, *Bacillus amyloliquefaciens* e *S. cerevisiae*. Entretanto, observamos que o índice de iodo-amido era menor nos frutos controle (4,0 e 3,9 nas safras 2013 e 2014, respectivamente) e naqueles tratados com quitosana (4,1) no primeiro ano (2013), ou seja, uma menor degradação do amido (índice menor), que poderia caracterizar frutos com maturação menos avançada (Tabela 9). Argenta, Vieira e Scolaro (2010) relataram que a firmeza de polpa de maçãs ‘Fuji’ não tem grande variação na planta ou logo após a colheita, não sendo o melhor atributo para avaliar a maturação ideal de colheita ou determinar o potencial de armazenamento dos frutos. Em ambos os anos de avaliação do experimento (2013 e 2014), observou-se que frutos tratados em pré-colheita com *S. cerevisiae*, *B. subtilis* e ABA apresentaram maior índice de iodo-amido na colheita, apesar de não se observar diferença na firmeza de polpa na colheita entre tratamentos (Tabela 9). Porém, após o armazenamento refrigerado, os frutos destes tratamentos possuíam uma menor firmeza de polpa (Tabela 10). Ou seja, estes produtos podem ter adiantado a maturação dos frutos e, conseqüentemente, promovido uma necessidade de colheita mais precoce ou armazenamento refrigerado por um período mais curto. Cantín, Fidelibus e Crisosto (2007) observaram que o tratamento pré-colheita com ABA adiantou a colheita de uvas ‘Crimson Seedless’ de 10 a 30 dias. Peppi, Fidelibus e Dokoozlian (2006) relataram que o tratamento de uvas

'Flame Seedless' em pré-colheita com ABA (75 a 300 mg L<sup>-1</sup>) acelera o amolecimento dos frutos e os torna mais suscetíveis a danos mecânicos. Porém, outros produtos aplicados em pré-colheita, como quitosana ou ASM, podem retardar ou promover o amadurecimento de morangos, respectivamente, como observado por Mazaro et al. (2008).

Na safra 2013, frutos controle apresentaram maior área com *russetting* que frutos tratados com quitosana, entretanto, estes não diferiram dos demais tratamentos, não parecendo ser um efeito da ação dos produtos alternativos (Tabela 9). Este efeito não se repetiu no segundo ano de avaliação (safra 2014), pois não se observou diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 9).

Tabela 9 - Atributos de qualidade e maturação de maçãs 'Fuji' na colheita. Os frutos tiveram 4 pulverizações (uma por semana) em pré-colheita com diferentes produtos alternativos. Avaliações realizadas 1 dia após a colheita. Safras 2013 e 2014.

Tratamentos	Firmeza de polpa (N)	AT (%)	SS (°Brix)	Índice Iodo-Amido	<i>Russetting</i> (cm <sup>2</sup> )	Cor vermelha (%)
Safra 2013						
Controle	66,2 <sup>ns</sup>	0,357 <sup>ns</sup>	13,7 <sup>ns</sup>	4,0 c	3,1 a	-
ASM (30 mg L <sup>-1</sup> )	66,0	0,372	14,4	4,3 b	2,2 ab	-
<i>S. cerevisiae</i> (6 mL L <sup>-1</sup> )	64,8	0,303	13,8	4,7 a	2,2 ab	-
Extr. cítrico (2 mL L <sup>-1</sup> )	65,5	0,301	13,7	4,2 b	2,3 ab	-
<i>B. subtilis</i> (10 mL L <sup>-1</sup> )	66,0	0,323	14,5	4,4 ab	2,1 ab	-
ABA (0,1 mL L <sup>-1</sup> )	66,0	0,262	13,5	4,4 ab	1,9 b	-
Quitosana (10 mL L <sup>-1</sup> )	65,4	0,326	14,1	4,1 bc	2,2 ab	-
Média	65,7	0,317	14,0	4,3	2,3	-
Desvio padrão	5,81	0,052	0,88	0,6	1,7	-
Safra 2014						
Controle	67,4 <sup>ns</sup>	0,373 <sup>ns</sup>	13,5 <sup>ns</sup>	3,9 c	1,26 <sup>ns</sup>	65,3 bc
ASM (30 mg L <sup>-1</sup> )	66,1	0,319	13,9	4,3 b	1,03	67,3 bc
<i>S. cerevisiae</i> (6 mL L <sup>-1</sup> )	66,8	0,327	13,6	4,7 a	1,41	55,4 d
Extr. cítrico (2 mL L <sup>-1</sup> )	68,3	0,344	14,1	4,2 b	1,46	68,0 bc
<i>B. subtilis</i> (10 mL L <sup>-1</sup> )	66,5	0,346	13,9	4,4 ab	1,22	61,9 cd
ABA (0,1 mL L <sup>-1</sup> )	67,8	0,375	13,7	4,5 a	1,57	74,0 a
Quitosana (10 mL L <sup>-1</sup> )	66,3	0,333	13,7	4,2 b	1,39	70,6 ab
Média	67,0	0,346	13,8	4,3	1,33	66,1
Desvio padrão	7,44	0,049	0,60	0,6	1,34	15,60

Médias seguidas da mesma letra, na coluna, em cada safra, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05). <sup>ns</sup> = não significativo (p<0,05). Fonte: produção do próprio autor, 2016.

Os frutos tratados com os produtos alternativos não apresentaram diferença de coloração da epiderme (*L*, *C*, *h<sup>o</sup>*) nas análises realizadas após a colheita e após o armazenamento, nas duas safras avaliadas (Tabelas 10 e 11). Entretanto, quando se avaliou o percentual de coloração vermelha da epiderme no segundo ano, observou-se que os frutos tratados em pré-colheita com ABA apresentavam os maiores valores (Tabela 9). Diversos trabalhos relataram que o efeito de melhora na pigmentação dos frutos, devido o tratamento com ABA, está relacionada ao acúmulo de antocianinas na epiderme ou no pericarpo dos frutos (PEPPI et al., 2006; CANTÍN; FIDELIBUS; CRISOSTO, 2007; WHEELER et al., 2009; WEI et al., 2011; SINGH et al., 2014). O composto precursor da antocianina (fenilalanina) é, também, precursor de uma série de compostos relacionados a defesa vegetal, como ácido caféico, ácido benzóico, lignina, entre outros, cuja reação é metabolizada pela enzima relaciona a defesa vegetal, fenilalanina amônia-liase (TAIZ; ZEIGER, 2015). Portanto, quando se observou redução do diâmetro de lesão de mofo-azul nas avaliações realizadas na colheita, no primeiro ano (2013) (Tabela 1), bem como, nas avaliações realizadas após o armazenamento

refrigerado de frutos inoculados com *P. expansum* e *C. perennans* (Tabela 5), poderia-se assumir que foi devido a uma indução de resistência nos frutos, considerando que ABA não afetou o crescimento de *P. expansum in vitro* (Tabela 7).

Tabela 10 - Atributos de coloração da epiderme de maçãs 'Fuji' na colheita. Os frutos receberam quatro pulverizações em pré-colheita, uma por semana, com diferentes produtos alternativos. Avaliações realizadas um dia após a colheita. Safras 2013 e 2014.

Tratamentos	Lado verde			Lado vermelho		
	<i>L</i>	<i>C</i>	<i>h</i> <sup>o</sup>	<i>L</i>	<i>C</i>	<i>h</i> <sup>o</sup>
Saфра 2013						
Controle	63,9 <sup>ns</sup>	28,5 <sup>ns</sup>	95,3 <sup>ns</sup>	42,9 <sup>ns</sup>	25,7 <sup>ns</sup>	28,8 <sup>ns</sup>
ASM (30 mg L <sup>-1</sup> )	54,0	28,1	97,1	43,1	24,4	30,0
<i>S. cerevisiae</i> (6 mL L <sup>-1</sup> )	54,1	28,8	98,4	44,0	25,1	32,1
Extr. cítrico (2 mL L <sup>-1</sup> )	65,3	28,9	98,7	44,6	24,7	31,9
<i>B. subtilis</i> (10 mL L <sup>-1</sup> )	64,9	29,2	96,9	44,4	23,7	34,3
ABA (0,1 mL L <sup>-1</sup> )	63,7	28,0	96,8	43,7	24,1	31,6
Qitosana (10 mL L <sup>-1</sup> )	63,4	28,6	98,2	42,2	25,1	27,6
Média	61,3	28,6	97,3	43,5	24,7	30,9
Desvio padrão	10,24	0,95	2,76	1,59	1,11	4,46
Saфра 2014						
Controle	71,1 <sup>ns</sup>	35,7 <sup>ns</sup>	104,1 <sup>ns</sup>	44,4 <sup>ns</sup>	30,7 <sup>ns</sup>	36,6 <sup>ns</sup>
ASM (30 mg L <sup>-1</sup> )	70,9	36,2	103,3	45,3	30,7	38,2
<i>S. cerevisiae</i> (6 mL L <sup>-1</sup> )	71,7	37,3	106,4	46,5	30,2	41,6
Extr. cítrico (2 mL L <sup>-1</sup> )	71,5	35,0	103,5	44,1	31,4	35,9
<i>B. subtilis</i> (10 mL L <sup>-1</sup> )	71,2	35,2	104,0	44,8	30,2	36,3
ABA (0,1 mL L <sup>-1</sup> )	70,8	34,8	102,2	44,7	30,9	35,4
Qitosana (10 mL L <sup>-1</sup> )	70,9	36,1	101,7	44,3	31,5	37,1
Média	71,2	35,8	103,6	44,9	30,8	37,3
Desvio padrão	1,31	1,31	3,49	1,67	1,81	3,86

Médias seguidas de <sup>ns</sup>, na coluna, em cada safra, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05). Fonte: produção do próprio autor, 2016.

No experimento 2, na colheita, observou-se que a firmeza de polpa dos frutos variou de 64,7 a 66,4 N, o teor de sólidos solúveis (SS) de 14,4 a 14,7% e a acidez titulável (AT) de 0,261 a 0,292%. Porém, não houve efeito de tratamento sobre estes atributos de maturação (Tabela 12). O índice iodo-amido foi maior nos frutos tratados com ASM nas doses de 60 e 120 µg mL<sup>-1</sup> (4,8 e 4,9, respectivamente), havendo, portanto, uma maior degradação do amido naqueles frutos, indicando que apresentavam uma maturação mais avançada na colheita (Tabela 12). O índice de iodo-amido nos frutos tratados com *S. cerevisiae*, em ambas as doses, não diferiu dos frutos controle (Tabela 12).

Não se observou diferença nos atributos de coloração dos frutos (*L*, *C*, *h*<sup>o</sup>) tanto na colheita quanto após o armazenamento refrigerado dos frutos (Tabelas 13 e 14). O *h*<sup>o</sup> avaliado na região mais verde dos frutos na colheita variou de 104,6 a 105,8 (Tabela 13), enquanto que após o armazenamento esses valores foram de 94,3 a 97,3 (Tabela 14), indicando que os frutos passaram de uma coloração mais próxima do verde na colheita, para amarelo após o armazenamento refrigerado, característico do processo de amadurecimento dos frutos. O valor médio de *h*<sup>o</sup> avaliado na região mais vermelha dos frutos foi de 37,5 com *C* de 30,6 e *L* de 44,00 (Tabela 13).

Tabela 11 - Atributos de qualidade de maçãs 'Fuji' após o armazenamento refrigerado ( $0\pm 0,5^{\circ}\text{C}$  UR  $90\pm 2\%$ ) mais sete dias a temperatura ambiente ( $22\pm 4^{\circ}\text{C}$ , UR  $70\pm 5\%$ ). Os frutos receberam quatro pulverizações (uma por semana) em pré-colheita com diferentes produtos alternativos. Safras 2013 e 2014.

Tratamentos	Firmeza de polpa (N)	AT (%)	SS (°Brix)	Cor da Epiderme		
				L	C	h°
Safra 2013						
Controle	57,7 a	0,186 <sup>ns</sup>	15,1 <sup>ns</sup>	66,8 <sup>ns</sup>	36,5 <sup>ns</sup>	90,6 <sup>ns</sup>
ASM (30 mg L <sup>-1</sup> )	56,8 ab	0,170	14,8	67,7	37,1	87,3
<i>S. cerevisiae</i> (6 mL L <sup>-1</sup> )	55,1 bc	0,148	14,2	68,2	37,8	89,1
Extr. cítrico (2 mL L <sup>-1</sup> )	54,8 bc	0,149	14,4	68,3	37,0	87,7
<i>B. subtilis</i> (10 mL L <sup>-1</sup> )	55,1 bc	0,145	14,1	68,5	36,2	95,1
ABA (0,1 mL L <sup>-1</sup> )	54,0 c	0,122	14,3	68,1	37,4	89,2
Qitosana (10 mL L <sup>-1</sup> )	56,5 ab	0,184	14,8	68,2	37,2	95,3
Média	55,7	0,158	14,5	68,0	37,0	90,6
Desvio padrão	8,39	0,043	0,92	1,54	1,17	2,76
Safra 2014						
Controle	59,1 a	0,162 <sup>ns</sup>	13,7 <sup>ns</sup>	71,4 <sup>ns</sup>	42,1 <sup>ns</sup>	93,5 <sup>ns</sup>
ASM (30 mg L <sup>-1</sup> )	57,8 ab	0,160	14,1	73,1	41,9	95,4
<i>S. cerevisiae</i> (6 mL L <sup>-1</sup> )	53,9 cd	0,172	12,7	73,8	42,9	99,1
Extr. cítrico (2 mL L <sup>-1</sup> )	56,1 bc	0,203	13,7	72,7	43,2	96,2
<i>B. subtilis</i> (10 mL L <sup>-1</sup> )	52,7 d	0,187	14,3	72,6	42,3	94,9
ABA (0,1 mL L <sup>-1</sup> )	51,3 d	0,189	13,2	71,7	40,6	93,3
Qitosana (10 mL L <sup>-1</sup> )	53,9 cd	0,209	14,3	72,0	42,2	83,0
Média	54,9	0,184	13,7	72,5	42,2	93,6
Desvio padrão	8,43	0,547	1,05	0,03	8,37	1,73

Médias seguidas da mesma letra, na coluna, em cada safra, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). <sup>ns</sup> = não significativo ( $p < 0,05$ ). Fonte: produção do próprio autor, 2016.

Tabela 12 - Atributos de maturação de maçãs 'Fuji' na colheita. Os frutos foram pulverizados ou não (controle) em pré-colheita com Acibenzolar-S-metil (ASM; 60 e 120 mg L<sup>-1</sup>) e mananoligossacarídeo fosforilado de *Sacharomyces cerevisiae* (Agromos®; 1 e 2 mL L<sup>-1</sup>) (quatro pulverizações, uma por semana). Avaliações realizadas um dia após a colheita.

Tratamento	Firmeza de polpa (N)	AT (%)	SS (°Brix)	Índice Iodo-Amido
Controle	66,4 <sup>ns</sup>	0,292 <sup>ns</sup>	14,6 <sup>ns</sup>	4,6 b
ASM 60 mg L <sup>-1</sup>	66,3	0,284	14,7	4,8 a
ASM 120 mg L <sup>-1</sup>	66,6	0,261	14,4	4,9 a
<i>S. cerevisiae</i> 1 mL L <sup>-1</sup>	64,7	0,286	14,4	4,6 b
<i>S. cerevisiae</i> 2 mL L <sup>-1</sup>	65,9	0,285	14,6	4,6 b
Média	66,0	0,283	14,5	4,7
Desvio padrão	7,23	0,021	0,62	0,3

Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). <sup>ns</sup> = não significativo ( $p < 0,05$ ). Fonte: produção do próprio autor, 2016.

Nas análises realizadas após o armazenamento refrigerado dos frutos, no experimento 2, foi observado que não houve efeito de tratamento sobre a AT e sobre os atributos de coloração da epiderme (L, C e h°) (Tabela 14). Todavia, efeito inconsistente, envolvendo o aumento ou redução do conteúdo de SS foi observado entre os tratamentos. Por exemplo, frutos tratados com a maior dose de *S. cerevisiae* (2 mL L<sup>-1</sup>) apresentaram maior teor de SS (15,2 °Brix), comparativamente a frutos controles (13,5 °Brix) ou tratados com a dose mais elevada de ASM (120 mg L<sup>-1</sup>) (14,0 °Brix), mas

não diferiu dos demais tratamentos, os quais apresentaram SS de 14,2 °Brix (ASM 60 mg L<sup>-1</sup>) e 14,3 °Brix (*S. cerevisiae* 1 mL L<sup>-1</sup>) (Tabela 14). Frutos controle, bem como, aqueles tratados com *S. cerevisiae* nas doses de 1 e 2 mL L<sup>-1</sup> apresentavam maior firmeza de polpa quando comparados com aqueles tratados com ASM, em ambas as doses (60 e 120 mg L<sup>-1</sup>), refletindo as diferenças na degradação do amido observadas na colheita (Tabela 12). Isto indica que o tratamento com ASM, possivelmente, adiantou a maturação dos frutos, enquanto que as doses testadas de mananoligossacarídeo fosforilado de *S. cerevisiae* não a afetaram (Tabelas 12 e 14). Zhang et al. (2011) não observaram diferença na firmeza de polpa e no conteúdo de SS de melões tratados com ASM (100 mg L<sup>-1</sup>), assim como observado neste trabalho nos frutos avaliados na colheita.

Tabela 13 - Atributos de coloração de maçãs ‘Fuji’ na colheita. Os frutos foram pulverizados ou não (controle) em pré-colheita com Acibenzolar-S-metil (ASM; Bion<sup>®</sup> 60 e 120 mg L<sup>-1</sup>) e mananoligossacarídeo fosforilado de *Sacharomyces cerevisiae* (Agromos<sup>®</sup>; 1 e 2 mL L<sup>-1</sup>) (quatro pulverizações, uma por semana). Avaliações realizadas um dia após a colheita.

Tratamentos	Lado verde			Lado vermelho		
	L	C	h°	L	C	h°
Controle	70,9 <sup>ns</sup>	37,0 <sup>ns</sup>	105,8 <sup>ns</sup>	42,5 <sup>ns</sup>	30,7 <sup>ns</sup>	36,6 <sup>ns</sup>
ASM 60 µg mL <sup>-1</sup>	70,8	37,2	105,7	43,7	30,7	37,2
ASM 120 µg mL <sup>-1</sup>	69,9	37,7	104,9	44,7	29,5	37,6
<i>S. cerevisiae</i> 1 mL L <sup>-1</sup>	70,8	36,2	104,6	45,6	30,9	39,2
<i>S. cerevisiae</i> 2 mL L <sup>-1</sup>	71,3	36,4	105,2	43,7	30,9	37,2
Média	70,8	36,9	105,3	44,0	30,6	37,5
Desvio padrão	0,97	1,29	2,09	1,83	1,04	3,45

Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05). <sup>ns</sup> = não significativo (p<0,05). Fonte: produção do próprio autor, 2016.

Tabela 14 - Atributos de qualidade pós-colheita de maçãs ‘Fuji’ após cinco meses de armazenamento refrigerado (0±0,5°C UR 90±2%) mais sete dias a temperatura ambiente (22±4°C, UR 70±5%). Os frutos foram pulverizados ou não (controle) em pré-colheita com Acibenzolar-S-metil (ASM; 60 e 120 mg L<sup>-1</sup>) e mananoligossacarídeo fosforilado de *Sacharomyces cerevisiae* (Agromos<sup>®</sup>; 1 e 2 mL L<sup>-1</sup>) (quatro pulverizações, uma por semana).

Tratamento	Firmeza de polpa (N)	AT (%)	SS (°Brix)	Cor da epiderme		
				L	C	h°
Controle	60,3 a	0,175 <sup>ns</sup>	13,5 b	73,0 <sup>ns</sup>	44,1 <sup>ns</sup>	97,3 <sup>ns</sup>
ASM 60 mg L <sup>-1</sup>	53,3 b	0,185	14,2 ab	71,7	43,5	95,8
ASM 120 mg L <sup>-1</sup>	54,0 b	0,148	14,0 b	72,3	44,5	96,6
<i>S. cerevisiae</i> 1 mL L <sup>-1</sup>	59,8 a	0,167	14,3 ab	72,9	43,0	94,3
<i>S. cerevisiae</i> 2 mL L <sup>-1</sup>	61,0 a	0,177	15,2 a	72,4	42,0	95,6
Média	58,1	0,171	14,3	72,5	43,3	95,9
Desvio padrão	9,79	0,025	0,99	1,31	1,95	3,27

Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05). <sup>ns</sup> = não significativo (p<0,05). Fonte: produção do próprio autor, 2016.

## 2.5 CONCLUSÃO

O tratamento em pré-colheita com produtos alternativos com características elicitoras de resistência inibe o desenvolvimento de mofo-azul e olho-de-boi em maçãs inoculadas. O efeito de inibição do desenvolvimento das lesões em frutos tratados em pre-colheita com ASM (30 mg L<sup>-1</sup>, Bion<sup>®</sup>) é menos evidente e de duração mais curta. O tratamento em pré-colheita com mananoligossacarídeo fosforilado de *S. cerevisiae* e *B. subtilis* em 2013 e mananoligossacarídeo fosforilado de *S. cerevisiae* em 2014 promovem a maior inibição do desenvolvimento de mofo-azul.

Maçãs ‘Fuji Kiko’ tratadas em pré-colheita com quitosana e mananoligossacarídeo fosforilado de *S. cerevisiae* apresentaram menor incidência de podridões após o armazenamento refrigerado nas safras 2013 e 2014, respectivamente.

O aumento da dose de ASM no tratamento de maçãs ‘Fuji’ em pré-colheita não melhora o efeito do produto sobre o desenvolvimento de mofo-azul em frutos inoculados na colheita.

Os produtos mananoligossacarídeo fosforilado de *S. cerevisiae*, extrato cítrico e *B. subtilis* incorporado em meio de cultura BDA inibiram o crescimento micelial de *P. expansum in vitro*.

O tratamento em pré-colheita com mananoligossacarídeo fosforilado de *S. cerevisiae*, *B. subtilis* e ABA aumentaram a degradação do amido na colheita e reduziram a firmeza de polpa após o armazenamento refrigerado dos frutos em ambas as safras (2013 e 2014). A pulverização de maçãs ‘Fuji’ em pré-colheita com ABA aumentou o índice de cor vermelha da epiderme na safra 2014. Os demais atributos de qualidade, maturação e coloração da epiderme não foram afetados devido a pulverização pré-colheita de produtos alternativos.

### 3 CONTROLE PÓS-COLHEITA DO MOFO-AZUL E QUALIDADE DE MAÇÃS ‘FUJI’ TRATADAS COM ÓLEOS ESSENCIAIS

#### 3.1 RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de óleos essenciais no crescimento *in vitro* de *Penicillium expansum*, bem como, o efeito da aplicação destes produtos em pós-colheita sobre a incidência e a severidade de mofo-azul (*P. expansum*) e a qualidade de maçãs ‘Fuji’ após o armazenamento refrigerado. Foi identificada a composição dos óleos essenciais de alecrim (*Rosmarinus officinalis*), canela (*Cinnamomum zeylaciium*), citronela (*Cymbopogon winterianus*), limão (*Citrus limonium*), tangerina (*Citrus reticulata*), cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), eucalipto (*Corymbia citriodora*) e gengibre (*Zingiber officinale*). Foram conduzidos quatro experimentos com óleos essenciais, dois *in vitro* e dois *in vivo*. No experimento um, foi avaliado o efeito dos óleos essenciais citados a cima em duas doses (100 e 1.000  $\mu\text{L L}^{-1}$ ) sobre a inibição do crescimento (%) de *P. expansum*, número e viabilidade de esporos. No experimento dois, foi avaliada a dose efetiva mediana (ED<sub>50</sub>) dos óleos de alecrim, canela, citronela, eucalipto e limão sobre o desenvolvimento de *P. expansum*. Nos experimentos *in vivo* foram avaliados os efeitos dos óleos já citados no diâmetro de lesão de mofo-azul (cm) e na qualidade pós-colheita [firmeza de polpa, sólidos solúveis, acidez titulável e coloração da epiderme (*L*, *C* e *h<sup>o</sup>*)] de maçãs ‘Fuji’, tratadas em pós-colheita sob refrigeração (0±0,5 °C/UR 90±2%) por 30 dias (doses de 0, 50, 100 e 500  $\mu\text{L L}^{-1}$ , experimento 3) ou por 2 dias (doses de 0, 100 e 500  $\mu\text{L L}^{-1}$ , experimento 4). Observou-se que os óleos essenciais avaliados apresentaram de 5 a 23 compostos de diferentes classes moleculares (terpenos, terpenoides e fenilpropanoides), em diferentes concentrações. Todos os óleos inibiram o crescimento *in vitro*, reduziram o número e a viabilidade de esporos de *P. expansum*, com efeito dependente da dose e dias de avaliação. A maior ED<sub>50</sub> foi observada para o óleo de alecrim (664,3  $\mu\text{L L}^{-1}$ ) e a menor para óleo de citronela (9,8  $\mu\text{L L}^{-1}$ ). Todos os óleos essenciais reduziram o diâmetro de lesão de mofo-azul após o armazenamento dos frutos, com efeito dependente da dose, período de tratamento e data de avaliação, e não afetaram os atributos de qualidades avaliados. Portanto, conclui-se que os óleos essenciais avaliados têm potencial pós-colheita de podridões.

Palavras-chave: *Malus domestica*. *Penicillium expansum*. Perdas. Podridão.

#### 3.2 INTRODUÇÃO

Maçãs ‘Fuji’ armazenadas por longos períodos ( $\geq 8$  meses) podem apresentar mais de 6% de perdas por podridões na abertura da câmara fria, e esses valores podem chegar a 23% após 7 dias em temperatura ambiente (ARGENTA et al., 2015). As podridões causadas por *Penicillium expansum*



Link. (mofo-azul) e *Cryptosporiopsis perennans* (Zeller & Childs) Wollenweber (1939) (podridão olho-de-boi) estão entre as mais importantes (BLUM et al., 2004). As perdas por mofo-azul podem ser elevadas em locais onde não se tenha boas práticas pós-colheita (BLUM et al., 2007), e perdas por olho-de-boi podem ultrapassar a 18% após longos períodos de armazenamento refrigerado ( $\geq 8$  meses), principalmente em lotes em que a firmeza de polpa reduz drasticamente e em frutos originários de áreas com histórico da doença (VALDEBENITO-SANHUEZA et al., 2006).

O uso de fungicidas em pós-colheita (como Tiabendazole, Benomil e Iprodione) nem sempre é eficiente no controle das podridões olho-de-boi e mofo-azul, e o uso de fungicidas em pré ou pós-colheita apresenta riscos ambientais e toxicológicos (BLUM et al., 2004). Além disso, alguns países, como Itália, vêm relatando a existência de cepas de *P. expansum* resistentes a fungicidas do grupo benzimidazol (BARALDI et al., 2003; NERI; MARI; BRIGATI, 2006).

Adicionalmente, a preocupação crescente com o meio ambiente, com a aquisição de vegetais livres de agrotóxicos e a exigência do mercado consumidor em adquirir produtos saudáveis, levam a necessidade de se encontrar soluções alternativas para o controle de doenças. Além disso, aumenta a preocupação da indústria com o aparecimento de casos de contaminação alimentar por bactérias, como *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* e *Salmonella*, e fungos, como *Colletotrichum* e *Penicillium*, em países como Nova Zelândia e EUA (POPA et al., 2007; MILLER et al., 2013). Neste caso, aparece como alternativa no manejo de doenças pós-colheita o uso de óleos essenciais.

Os óleos essenciais são complexas misturas de diversos componentes (20-60), em diferentes concentrações. Normalmente, eles são caracterizados por dois ou três principais componentes em maiores concentrações (20-70%), outros em baixas concentrações, e ainda outros em quantidades extremamente baixas, chamados de traços (FILLIPIS, 2001; BAKKALI et al., 2008). Os principais constituintes nos óleos essenciais são caracterizados pelo baixo peso molecular (BAKKALI et al., 2008), destacando-se hidrocarbonetos terpênicos, alcoóis simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas e compostos com enxofre (SILVEIRA et al., 2012), sendo estes pertencentes aos grupos dos terpenos, terpenoides e compostos fenólicos aromáticos.

Diversos trabalhos têm mostrado efeitos positivos dos óleos ou seus componentes no controle de fungos (NERI; MARI; BRIGATI, 2006; TAO; JIA; ZHOU, 2014; BOMFIM et al., 2015), bactérias (PATRIGNANI et al., 2008; SUM et al., 2014) e vírus (ELIZAQUÍVEL et al., 2013; ORABY; EL-BOROLLOS, 2013). Tao; Jia; Zhou (2014) observaram que o óleo essencial de *Citrus reticulata* inibiu o crescimento de *Penicillium italicum* e *P. digitatum in vitro*, e alterou a morfologia de hifas e a integridade da membrana plasmática dos fungos, provocando extravasamento de líquido celular. O óleo essencial de alecrim também causou extravasamento de líquido celular e inibiu o crescimento de *Fusarium verticillioides*, além de reduzir a produção de ergosterol pelo fungo (BOMFIM et al., 2015). Os óleos essenciais de tomilho, orégano e capim-limão incorporados ao meio de cultura inibiram completamente o crescimento *in vitro* de *Botrytis cinerea* e *Alternaria arborescens*, e a vaporização dos óleos essenciais de tomilho e orégano inibiram o crescimento de *Rhizopus stolonifer* em 69 e 64%, respectivamente (PLOTTO; ROBERTS; ROBERTS, 2003). Sum et al. (2014) observaram considerável redução do crescimento de *Escherichia coli* e *Penicillium digitatum* devido a utilização *in vivo* e *in vitro* de carvacrol, cinamaldeído e trans-cinamaldeído, compostos majoritários em alguns óleos essenciais, como de canela, cravo-da-índia, orégano e tomilho. Porém, o efeito inibidor do crescimento, alteração de morfologia de hifas e rompimento de membranas de microrganismos pode ser diferenciado, conforme o óleo essencial, a dose utilizada e o patógeno em questão (PLOTTO; ROBERTS; ROBERTS, 2003; DROBY et al., 2008; LORENZETTI et al., 2011; SUM et al., 2014; BOMFIM et al., 2015).

Pode-se observar que diversos trabalhos relatam o efeito de óleos essenciais sobre a inibição do crescimento de diferentes fungos *in vitro*, entretanto, poucos, ainda, relatam o efeito *in vivo*.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da aplicação pós-colheita de óleos essenciais [alecrim (*Rosmarinus officinalis*), canela (*Cinnamomum zeylacium*), citronela (*Cymbopogon winterianus*), limão (*Citrus limonium*), tangerina (*Citrus reticulata*), cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), eucalipto (*Corymbia citriodora*) e gengibre (*Zingiber officinale*)] sobre a incidência e

o desenvolvimento de mofo-azul (*P. expansum*) e a qualidade de maçãs 'Fuji' armazenadas sob refrigeração, bem como, os efeitos dos óleos no crescimento *in vitro* de *P. expansum*.

### 3.3 MATERIAL E MÉTODOS

Para testar a eficiência dos óleos essenciais sobre o crescimento do fungo *P. expansum* (mofo-azul) foram conduzidos quatro experimentos, dois *in vitro* e dois *in vivo*, utilizando os óleos essenciais de alecrim (*Rosmarinus officinalis*), canela (*Cinnamomum zeylacium*), citronela (*Cymbopogon winterianus*), limão (*Citrus limonium*), tangerina (*Citrus reticulata*), cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), eucalipto (*Corymbia citriodora*) ou gengibre (*Zingiber officinale*), que foram aplicados por vaporização.

Os compostos aromáticos presentes nos óleos essenciais utilizados no presente trabalho foram quantificados no Laboratório de Química de Produtos Naturais da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, através de cromatografia gasosa/espectrometria de massa (GC/MS Agilent Quadrupolo), conforme metodologia descrita por Ribeiro et al. (2015).

O experimento 1 foi conduzido *in vitro*, onde os óleos essenciais, nas doses de 100 e 1.000  $\mu\text{L L}^{-1}$  foram aplicados por vaporização. Na tampa de placas de Petri com meio de cultura BDA (Batata Dextrose Agar) foi colocado um adesivo e neste a quantidade de óleo essencial necessária para atingir as concentrações de interesse, calculado através da seguinte fórmula:

$$C_1 * V_1 = C_2 * V_2 \quad [2]$$

Onde:  $C_1$  é a concentração de óleo essencial desejada ( $\mu\text{L L}^{-1}$ );  $V_1$  é o volume livre na placa de Petri, obtido através da subtração do volume da placa de Petri (0,012 L) e o volume de meio de cultura colocado na mesma (0,006 L);  $C_2$  é a concentração do óleo (100%); e  $V_2$  é o valor a ser calculado (x), que seria o volume de óleo necessário para atingir a concentração de interesse no interior da placa de Petri.

No tratamento controle foi colocado o adesivo e água destilada esterilizada.

Em cada placa foi isolado um disco de 0,7 cm de diâmetro com o fungo *P. expansum* proveniente de colônias com 10 dias de idade. As placas de Petri foram acondicionadas em B.O.D a 23 °C e fotoperíodo de 12 horas. Foram utilizadas 10 placas de Petri para cada tratamento, sendo cada placa de Petri uma repetição. Em cada tratamento foram avaliados a inibição do crescimento (IC, %) e o número e a viabilidade de esporos.

Aos 6 e 10 após o isolamento foi medido o diâmetro de colônia utilizando uma régua, para determinar a IC, que foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{IC (\%)} = [(Dc - Dt) / Dc] * 100 \quad [3]$$

Onde: Dc (cm) é o diâmetro de colônia do tratamento controle; e Dt (cm) é o diâmetro de colônia nos tratamentos com óleos essenciais.

Aos 10 dias após o isolamento, para determinar o número de esporos, foi colocado 5 mL de uma solução de Tween 20 (0,05%) e água destilada autoclavada sobre as colônias de *P. expansum* nas placas de Petri, utilizado um bastão de vidro para liberação dos esporos e, com auxílio da câmara de Neubauer (hemacitômetro) sob o microscópio, foi contado o número de esporos em uma amostra provinda de cada placa de Petri, utilizando-se 5 repetições por tratamento. Contou-se os esporos da área quadriculada central da câmara de Neubauer. O número de esporos contados foi multiplicado por 10.000 para obter-se o número de esporos por mL de solução (FERNANDEZ, 1993).

A viabilidade de esporos (%) foi realizada a partir da solução utilizada para a contagem do número de esporos aos 10 dias após o isolamento. Colocou-se 0,5 mL da solução de esporos em placas de Petri com meio ágar-água. As placas foram seladas e incubadas em B.O.D. a 23 °C e fotoperíodo de 12 horas. Após 24 ou 48 horas, com auxílio do microscópio, foram contados os esporos, a cada 100, que apresentavam tubo germinativo igual ou superior ao seu tamanho. Foram utilizadas três repetições para cada tratamento, em cada período de avaliação (24 e 48 horas após o estímulo à germinação).

No experimento 2, *P. expansum* foi cultivado em meio de cultura BDA com as doses de 0, 10, 50, 100, 500 e 1.000  $\mu\text{L L}^{-1}$  dos óleos de alecrim (*Rosmarinus officinalis*), canela (*Cinnamomum*

*zeylacium*), citronela (*Cymbopogon winterianus*) e eucalipto (*Eucalyptus citriodora*), e com as doses de 0, 10, 50, 100, 500 e 2.300  $\mu\text{L L}^{-1}$  do óleo de limão (*Citrus limonium*). Aos 10 dias após o isolamento foi avaliado a IC em cada óleo essencial, como já descrito para o experimento 1, e então foi ajustado equações de regressão para cada óleo e estimada a dose efetiva mediana ( $ED_{50}$ ), ou seja, a dose necessária para inibir 50% do crescimento do fungo.

Para os experimentos 3 e 4, maçãs ‘Fuji’ foram colhidas em pomar comercial do município de Vacaria, RS (28° 30' 44" de latitude sul e 50° 56' 02" de latitude oeste). Após a colheita, os frutos foram transportados ao laboratório onde as amostras foram homogeneizadas.

Após a homogeneização das amostras, os frutos foram desinfestados em uma solução de hipoclorito de sódio (1,5%) por 3 minutos. Posteriormente, foram lavados com água para retirada do resíduo da solução e permaneceram aproximadamente 2 horas em temperatura ambiente ( $\sim 23^\circ\text{C}$ ) até secarem. Os frutos foram perfurados na região equatorial (1 orifício por fruto) com auxílio de um texturômetro eletrônico TAXT plus, equipado com ponteira de 2 mm de diâmetro, e programado para penetrar até 4 mm de profundidade no fruto. Em cada orifício foi realizada a inoculação, colocando 10  $\mu\text{L}$  de uma solução de  $10^6$  esporos por mL de *P. expansum*. A solução de esporos foi preparada a partir de colônias puras de *P. expansum* com 10 dias de idade. Uma solução de Tween 20 (0,05%) mais água destilada esterilizada foi colocada sobre a colônia de *P. expansum*, e com auxílio de um bastão de vidro foi feita a liberação dos esporos. A contagem do número de esporos foi realizada com auxílio de uma câmara de Neubauer (hemacitômetro) e ajustado até se obter o volume de esporos desejado.

Após a inoculação, os frutos foram pesados e colocados em recipientes com capacidade de 4,1 L. Foram utilizados 10 frutos por frasco e quatro frascos por tratamento, cada um representando uma repetição.

O volume de óleo essencial necessário para atingir as concentrações de interesse foi calculado com a fórmula [2], decrita anteriormente.

Uma parte dos frutos homogeneizados, mas não inoculados, foi utilizada para as análises físico-químicas nos experimentos 3 e 4, utilizando-se 4 repetições de 10 frutos.

No experimento 3, os frutos inoculados foram armazenados sob refrigeração ( $0\pm 0,5^\circ\text{C/UR } 90\pm 2\%$ ) por 30 dias, com as doses de 0, 50, 100 e 500  $\mu\text{L L}^{-1}$  dos óleos essenciais. Após este período de armazenamento refrigerado, seguido de 0 a 5 dias em temperatura ambiente ( $22\pm 4^\circ\text{C/UR } 70\pm 5\%$ ), avaliou-se a severidade (diâmetro da lesão; cm) de mofo-azul (*P. expansum*). Os frutos não inoculados foram tratados sob refrigeração ( $0^\circ\text{C}\pm 0,5^\circ\text{C/UR } 90\pm 2\%$ ) por 30 dias com as doses 0, 50, 100 e 500  $\mu\text{L L}^{-1}$  dos óleos essenciais de alecrim, canela, citronela, eucalipto e gengibre. Avaliou-se a firmeza de polpa, teor de sólidos solúveis (SS), acidez titulável (AT) e cor de fundo da epiderme após 5 meses de armazenamento refrigerado ( $0\pm 0,5^\circ\text{C/UR } 90\pm 2\%$ ), mais 7 dias em temperatura ambiente ( $22\pm 4^\circ\text{C/UR } 70\pm 5\%$ ). A firmeza de polpa (N) foi determinada na região equatorial dos frutos, em duas regiões opostas, após remoção de uma pequena porção da epiderme, com o auxílio de um penetrômetro eletrônico (GÜSS Manufacturing Ltd, Cidade do Cabo, África do Sul) equipado com ponteira de 11 mm de diâmetro. Os valores de AT (% ácido málico) foram obtidos através de uma amostra de 10 mL de suco, obtido pelo processamento dos frutos em uma centrífuga. Essa amostra foi diluída em 90 mL de água destilada e titulada com solução de NaOH 0,1N até pH 8,1. Para titulação das amostras foi utilizado um titulador automático TitroLine® Easy da SCHOTT Instruments (Mainz, Alemanha). Os teores de SS (°Brix) foram determinados em um refratômetro digital modelo PR201 $\alpha$  (Atago®, Tóquio, Japão). A determinação da cor da epiderme foi efetuada com um colorímetro Minolta, modelo CR 400 (Tóquio, Japão), sendo as leituras realizadas na região equatorial do fruto menos expostas à radiação, correspondendo à região menos vermelha, e os resultados expressos nos atributos *L*, *C* e *h*°. O *h*° (ângulo *hue*) define a coloração básica, sendo 0° - vermelho, 90° - amarelo e 180° - verde. O *L* (*lightness*) define a luminosidade, que varia de zero (preto) a 100 (branco). O *C* define a cromaticidade (quanto maior, mais intensa é a definição de cor).

No experimento 4, os frutos inoculados ficaram armazenados por 2 dias com as doses de 0, 100 e 500  $\mu\text{L L}^{-1}$  de óleo essencial, mais 43 dias sem os óleos essenciais, totalizando 45 dias de armazenamento sob refrigeração ( $0\pm 0,5^\circ\text{C/UR } 90\pm 2\%$ ). Após 45 dias de armazenamento foi avaliado diariamente a severidade da doença (diâmetro da lesão; cm), durante seis dias em temperatura

ambiente ( $22\pm 4^{\circ}\text{C}/\text{UR } 70\pm 5\%$ ). Os frutos não inoculados foram tratados por 2 dias sob refrigeração com as doses de 0, 100 e  $500 \mu\text{L L}^{-1}$  dos óleos essenciais de alecrim, canela, citronela, cravo-da-índia, eucalipto, gengibre, limão e tangerina. Avaliou-se a firmeza de polpa, teor de sólidos solúveis (SS), acidez titulável (AT) e cor de fundo da epiderme após 4 meses de armazenamento refrigerado ( $0\pm 0,5^{\circ}\text{C}/\text{UR } 90\pm 2\%$ ), mais 7 dias em temperatura ambiente ( $22\pm 4^{\circ}\text{C}/\text{UR } 70\pm 5\%$ ), conforme descrito no experimento 3.

Os dados foram submetidos à análise da variância (ANOVA), utilizando o programa SAS (SAS Institute, Inc., Cary, NC). As médias de inibição do crescimento de *P. expansum in vitro* (experimento 1), número e viabilidade de esporos (experimento 1), severidade de mofo-azul (experimentos 3 e 4), parâmetros físico-químicos ( $L$ ,  $C$ ,  $h^{\circ}$ , firmeza de polpa, SS e AT, experimentos 3 e 4) foram comparadas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Para estimar a taxa de evolução da podridão nos experimentos 3 e 4, os dados de severidade (diâmetro da lesão; cm) foram submetidos à análise de regressão linear e os coeficientes angulares das retas ( $b$ ) comparados dois a dois através do teste  $t$ . No experimento 2, os dados de percentual inibitório para cada óleo essencial foram submetidos a análise de regressão linear e através da equação, estimado a  $ED_{50}$ . Os dados em porcentagem foram transformados através da equação arco seno  $(y/100)^{1/2}$ .

### 3.4 RESULTADOS

#### 3.4.1 Composição dos óleos essenciais

Através da análise de composição química dos óleos essenciais, observou-se que estes possuem uma diversa gama de componentes em quantidades variadas (Tabelas 15 e 16). Dentre os óleos essenciais avaliados no presente trabalho, identificou-se cinco componentes no óleo essencial de cravo-da-índia, e até 23 componentes no óleo essencial de citronela (Tabelas 15 e 16). Os óleos essenciais de cravo-da-índia e canela apresentaram 87% de compostos fenólicos (fenilpropanoides) em sua composição, sendo eugenol o principal composto presente nestes óleos (86,6 e 82,7%, respectivamente) (Tabela 15). Os óleos essenciais de limão e tangerina apresentaram 98,3 e 100% de monoterpenos em sua composição, respectivamente, sendo limoneno o principal componente nestes óleos (66,5 e 85,4%, respectivamente) (Tabela 16). Além de monoterpenos e compostos fenólicos, os óleos essenciais de algumas espécies vegetais podem apresentar a maioria de seus componentes pertencente a classe dos terpenoides, como foi identificado nos óleos de alecrim, citronela e eucalipto (Tabelas 15 e 16). Nos óleos de citronela e eucalipto identificou-se citronelal como o principal composto, com 36,2 e 80,3% do componente nestes óleos, respectivamente (Tabelas 15 e 16). O óleo essencial de alecrim possui 48,2% de eucaliptol (Tabela 16), sendo este o composto majoritário. Sesquiterpeno foi a principal classe molecular dos compostos identificados no óleo essencial de gengibre (82%), sendo  $\alpha$ -zingibereno o principal componente, representando 38,1% da composição deste óleo essencial (Tabela 16).

Tabela 15- Composição química dos óleos essenciais de alecrim (*Rosmarinus officinalis*), canela (*Cinnamomum zeylacium*), citronela (*Cymbopogon winterianus*) e cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) utilizados neste estudo.

Composto <sup>a</sup>	IK <sup>b</sup>	Área relativa (%)				Classe molecular
		Alecrim	Canela	Citronela	Cravo	
$\alpha$ -Pinenol	939	13,6	0,81	-	-	Monoterpeno
Canfeno	954	2,94	0,25	-	-	Monoterpeno
$\beta$ -Pinenol	979	7,08	0,21	-	-	Monoterpeno
$\beta$ -Mirceno	990	0,72	-	-	-	Monoterpeno
$\alpha$ -Felandreno	1002	0,14	0,96	-	-	Monoterpeno
$\alpha$ -Terpineno	1017	0,28	-	-	-	Monoterpeno
$\rho$ -cimene	1024	1,27	0,85	-	-	Monoterpeno
Limoneno	1029	2,43	-	3,20	-	Monoterpeno
Eucaliptol	1031	48,15	-	-	-	Monoterpenoide
$\gamma$ -Terpineno	1059	0,41	-	-	-	Monoterpeno
Terpinoleno	1088	0,17	-	-	-	Monoterpeno
Linalol	1098	0,77	1,59	0,52	-	Monoterpeno
Cânfora	1146	15,44	-	-	-	Monoterpenoide
Isopulegol	1149	-	-	0,87	-	Monoterpeno
Citronelal	1153	-	-	36,18	-	Monoterpenoide
Iso-isopulegol	1159	-	-	0,53	-	Monoterpeno
Borneol	1169	1,67	-	-	-	Monoterpenoide
Terpinen-4-ol	1177	0,32	-	-	-	Monoterpenoide
$\alpha$ -Terpineol	1188	0,83	-	-	-	Monoterpenoide
Citronelol	1225	-	-	12,82	-	Monoterpeno
Geraniol	1252	-	-	18,85	-	Monoterpenoide
Geranial	1267	-	-	0,44	-	Monoterpenoide
E-cinamaldeído	1270	-	0,94	-	-	Fenilpropanoide
Safrol	1287	-	1,09	-	-	Fenilpropanoide
Acetato de bornila	1288	0,28	-	-	-	Fenilpropanoide
Acetato de citronelol	1352	-	-	3,60	-	Monoterpeno
Eugenol	1359	-	82,68	0,68	85,27	Fenilpropanoide
Acetato de geranila	1381	-	-	2,87	-	Monoterpeno
$\beta$ -elemeno	1390	-	-	3,00	-	Sesquiterpeno
Trans- $\beta$ -cariofileno	1419	3,52	3,42	-	11,47	Sesquiterpeno
Acetato de trans-cinamila	1446	-	1,17	-	-	Fenilpropanoide
$\alpha$ -cariofileno	1454	-	-	-	1,31	Sesquiterpeno
Allo-aromadendreno	1460	-	0,53	-	-	Sesquiterpeno
Germacreno-D	1484	-	-	2,13	-	Sesquiterpeno
$\alpha$ -muurolo	1500	-	-	0,92	-	Sesquiterpeno
Germacreno-A	1509	-	-	0,60	-	Sesquiterpeno
$\gamma$ -cadineno	1513	-	-	0,91	-	Sesquiterpeno
Acetato de eugenol	1522	-	2,25	-	-	Fenilpropanoide
$\delta$ -cadineno	1523	-	-	3,52	0,25	Sesquiterpeno
Elemol	1549	-	-	4,24	-	Sesquiterpeno
Germacreno-D-4-ol	1575	-	-	0,70	-	Sesquiterpeno
Óxido de cariofileno	1583	-	-	-	0,28	Sesquiterpeno
$\gamma$ -eudesmol	1632	-	-	0,52	-	Sesquiterpenoide
Muurolo	1646	-	-	0,93	-	Sesquiterpenoide
$\beta$ -eudesmol	1650	-	-	0,51	-	Sesquiterpenoide
$\alpha$ -eudesmol	1653	-	-	1,45	-	Sesquiterpenoide
Benzoato de benzila	1760	-	3,24	-	-	Fenilpropanoide

<sup>a</sup> Compostos listados em ordem crescente de índice Kovats (IK). <sup>b</sup> Índice Kovats (IK) em coluna HP-5. Fonte: produção do próprio autor, 2016.

Tabela 16- Composição química dos óleos essenciais de eucalipto (*Corymbia citriodora*), gengibre (*Zingiber officinale*), limão (*Citrus limonium*) e tangerina (*Citrus reticulata*) utilizados neste estudo.

Composto <sup>a</sup>	IK <sup>b</sup>	Área relativa (%)				Classe molecular
		Eucalipto	Gengibre	Limão	Tangerina	
$\alpha$ -tujeno	930	-	-	0,32	0,32	Monoterpeno
$\alpha$ -Pinoeno	939	0,21	1,96	1,82	1,34	Monoterpeno
Canfeno	954	-	6,48	-	-	Monoterpeno
Sabineno	975	-	-	1,41	0,34	Monoterpeno
$\beta$ -Pinoeno	979	0,52	-	8,89	0,53	Monoterpeno
$\beta$ -Mirceno	990	-	0,49	1,32	1,75	Monoterpeno
1,4-cineol	1014	-	-	0,59	-	Monoterpenóide
$\alpha$ -Terpinoeno	1017	-	-	0,84	-	Monoterpeno
$\rho$ -cimene	1024	-	-	4,68	0,69	Monoterpeno
Limoneno	1029	-	5,20	66,49	85,39	Monoterpeno
Eucaliptol	1031	0,70	2,42	0,44	-	Monoterpenoide
$\gamma$ -Terpinoeno	1059	-	-	9,23	8,99	Monoterpeno
Terpinoleno	1088	-	-	3,27	0,35	Monoterpeno
Linalol	1098	0,20	-	-	0,29	Monoterpeno
Isopulegol	1149	8,16	-	-	-	Monoterpeno
Citronelal	1153	80,34	-	-	-	Monoterpenoide
Borneol	1169	-	0,87	-	-	Monoterpenoide
Neoiso-isopulegol	1171	0,40	-	-	-	Monoterpeno
Citronelol	1225	7,59	-	-	-	Monoterpeno
Acetato de citronelol	1352	0,52	-	-	-	Monoterpeno
$\alpha$ -copaeno	1376	-	0,54	-	-	Sesquiterpeno
Acetato de geranila	1381	-	0,85	-	-	Monoterpeno
$\beta$ -elemeno	1390	-	0,83	-	-	Sesquiterpeno
Trans- $\beta$ -cariofileno	1419	0,98	-	-	-	Sesquiterpeno
$\gamma$ -elemeno	1436	-	0,61	-	-	Sesquiterpeno
$\beta$ -farnesene	1456	-	0,39	-	-	Sesquiterpeno
Trans-Cadina-1(6),4-dieno	1476	-	0,63	-	-	Sesquiterpeno
$\alpha$ -curcumeno	1480	-	12,65	-	-	Sesquiterpeno
$\gamma$ -curcumeno	1482	-	0,41	-	-	Sesquiterpeno
$\alpha$ -zingibereno	1493	-	38,14	-	-	Sesquiterpeno
$\alpha$ -amorfeno	1495	-	2,44	-	-	Sesquiterpeno
$\beta$ -bisaboleno	1505	-	11,66	-	-	Sesquiterpeno
$\gamma$ -cadineno	1513	-	0,49	-	-	Sesquiterpeno
$\beta$ -sesquifelandreno	1522	-	12,04	-	-	Sesquiterpeno
Acetato de eugenol	1522	-	0,46	-	-	Fenilpropanoide
Trans- $\delta$ -bisaboleno	1531	-	0,45	-	-	Sesquiterpeno

<sup>a</sup> Compostos listados em ordem crescente de índice Kovats (IK). <sup>b</sup> Índice Kovats (IK) em coluna HP-5. Fonte: produção do próprio autor, 2016.

### 3.4.2 Efeito dos óleos essenciais sobre o crescimento de *Penicillium expansum* *in vitro*

Todos os óleos essenciais testados neste trabalho inibiram o crescimento de *P. expansum* (Figura 1) e reduziram o número de esporos produzidos pelo fungo (Tabela 17), porém com variação no efeito conforme o óleo essencial e a dose utilizada.

Quando se utilizou a dose de 100  $\mu$ L L-1 dos óleos essenciais de canela, citronela, cravo e eucalipto observou-se que a inibição no crescimento do fungo em ambas as datas de avaliação variou de 57 a 86%, sendo estes a maior taxa de inibição entre os óleos testados nesta dose (Figura 1).

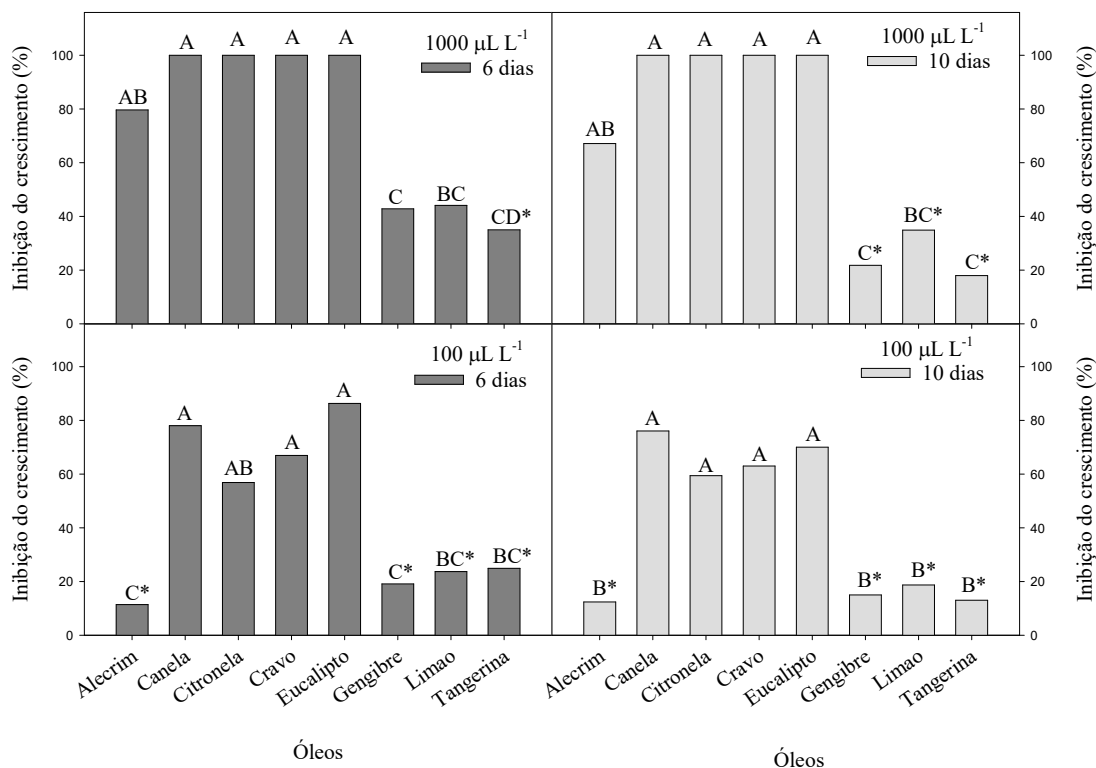
Para o óleo essencial de alecrim, a inibição do crescimento do fungo foi de apenas 11% aos 6 dias após o isolamento (Figura 1). Os óleos de gengibre, limão e tangerina também promoveram baixa

taxa de inibição do crescimento de *P. expansum*, em torno de 20%, não diferindo estatisticamente do óleo de alecrim e estes não diferindo estatisticamente da inibição de 0% do tratamento controle (Figura 1).

Apesar da menor taxa de inibição no crescimento *in vitro* de *P. expansum* com os óleos essenciais de tangerina, limão, gengibre e alecrim, estes reduziram significativamente o número de esporos do fungo (Tabela 17). Entretanto, a viabilidade destes foi de quase 100% 24 horas após a indução a germinação e de 100% após 48 horas, não diferindo da viabilidade de esporos do tratamento controle (Tabela 17). Após 48 horas de indução a germinação, a menor viabilidade de esporos foi observada no tratamento com óleo essencial de eucalipto, atingindo 68% (Tabela 17).

A dose de 1.000  $\mu\text{L L}^{-1}$  dos óleos essenciais de canela, citronela, cravo e eucalipto promoveu a inibição total do crescimento de *P. expansum in vitro*, tanto aos seis quanto aos 10 dias após o isolamento (Figura 1 e 2).

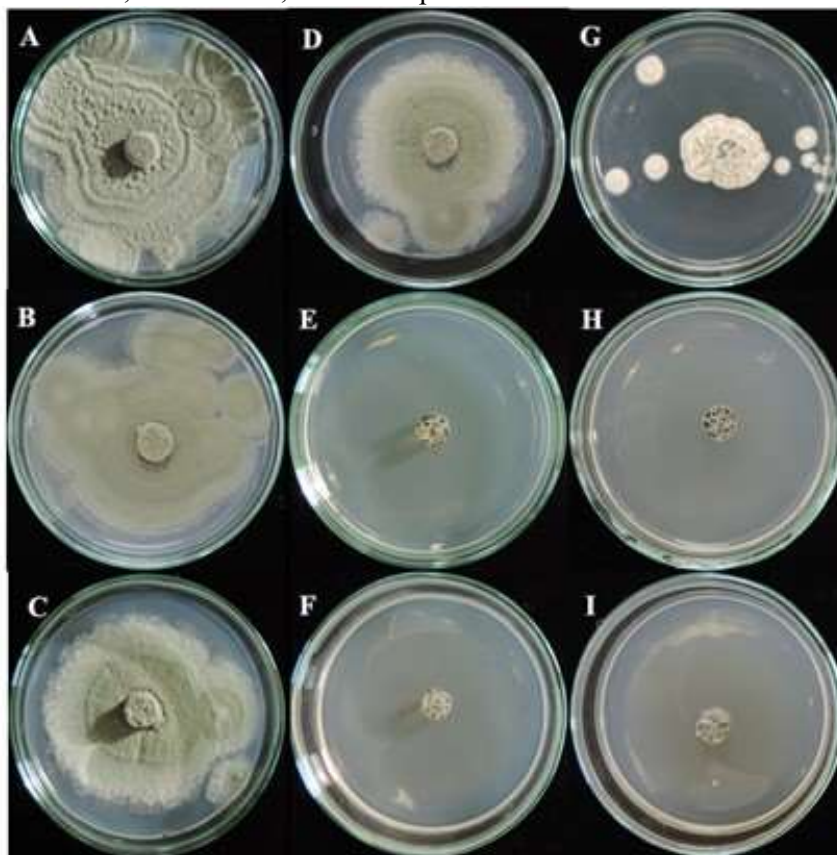
Figura 1- Inibição do crescimento (IC; %) *in vitro* de *Penicillium expansum* Link, aos 6 e 10 dias após o isolamento, cultivado em meio de cultura BDA, incubado em B.O.D. a 23 °C com fotoperíodo de 12 horas, na presença de óleos essenciais volatilizados de diferentes espécies de plantas, nas doses de 1000  $\mu\text{L L}^{-1}$  e 100  $\mu\text{L L}^{-1}$ . Barras com a mesma letra em cada dose e data de avaliação não diferem pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Letras seguidas de \* não diferem do tratamento controle (IC=0%) pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).



Fonte: produção do próprio autor, 2016.

O óleo essencial de alecrim na dose de 1.000  $\mu\text{L L}^{-1}$  inibiu em 80% e 67% o crescimento de *P. expansum* aos seis e 10 dias após o isolamento, respectivamente, não diferindo significativamente da inibição total promovida pelos óleos de canela, citronela, cravo e eucalipto. Para a dose de 1.000  $\mu\text{L L}^{-1}$  a menor inibição no crescimento de *P. expansum* foi obtida com o óleo essencial de tangerina, sendo esta de 35% aos seis dias após o isolamento, e ainda mais baixa aos 10 dias após o isolamento (18%), porém não diferindo da inibição de apenas 22% obtida com o óleo essencial de gengibre (Figura 1 e 2). Apesar de se observar uma inibição de 18 a 35% aos 10 dias após o isolamento, os óleos essenciais de gengibre, limão e tangerina não diferiram significativamente da inibição de 0% obtida com o tratamento controle (Figura 1 e 2).

Figura 2 - Colônias de *Penicillium expansum* após 10 dias de incubação com diferentes óleos essenciais volatilizados na dose de  $1.000 \mu\text{L L}^{-1}$ . As letras correspondem ao tratamento com os seguintes óleos essenciais: A – controle, B – limão, C – gengibre, D – tangerina, E – citronela, F – canela, G – alecrim, H – eucalipto e I – cravo-da-índia.



Fonte: produção do próprio autor, 2016.

O tratamento com a dose de  $1.000 \mu\text{L L}^{-1}$  dos óleos de alecrim, canela, citronela, cravo e eucalipto promoveram o menor número de esporos de *P. expansum* e a menor taxa de germinação de esporos 24 horas após o estímulo, com valores em torno de 0% (Tabela 17). Após 48 horas do estímulo a germinação, o tratamento com o óleo essencial de alecrim promoveu metade dos esporos germinados (53%), os óleos de cravo-da-índia e eucalipto se observaram os menores índices de viabilidade de esporos, aproximadamente 20%, entretanto, com o óleo essencial de citronela, já se observava 92% de esporos de *P. expansum* germinados (Tabela 17).

Observou-se grande variação nos valores de  $ED_{50}$  entre os óleos essenciais avaliados neste experimento (Tabela 18). O óleo essencial de citronela foi o mais eficiente, com uma  $ED_{50}$  de  $9,8 \mu\text{L L}^{-1}$ . O maior valor de  $ED_{50}$  foi obtido para o óleo essencial de alecrim ( $664,3 \mu\text{L L}^{-1}$ ). Observou-se que os óleos essenciais de canela, eucalipto e limão tiveram uma  $ED_{50}$  intermediária entre os analisados neste experimento, com valores de 35,6; 54,9 e  $189,7 \mu\text{L L}^{-1}$ , respectivamente.



Tabela 17 - Número ( $\times 10^6$ ) e viabilidade (%) de esporos de *Penicillium expansum* Link, 24 e 48 horas após o estímulo a germinação, mantidos em B.O.D. por 10 dias (23 °C, fotoperíodo de 12 horas) em meio de cultura BDA com diferentes óleos essenciais volatilizados, nas doses de 100 e 1.000  $\mu\text{L L}^{-1}$ .

Óleo	Esporos.mL <sup>-1</sup> (*10 <sup>6</sup> )	Viabilidade de esporos (%)	
		24 horas	48 horas
100 $\mu\text{L L}^{-1}$			
Controle	154,5 a	97 a	100 a
Alecrim	57,9 bc	87 ab	97 ab
Canela	20,4 c	63 b	78 ab
Citronela	47,9 c	62 b	92 ab
Cravo	34,7 c	58 b	83 ab
Eucalipto	19,7 c	58 b	68 b
Gengibre	44,0 c	94 a	100 a
Limão	96,9 b	83 ab	100 a
Tangerina	54,7 bc	82 ab	100 a
Média	59,9	76	91
Desvio padrão	46,8	17,5	13,9
1.000 $\mu\text{L L}^{-1}$			
Controle	153,2 a	93 a	100 a
Alecrim	1,7 d	0 b	53 bc
Canela	3,1 d	3 b	67 ab
Citronela	0,7 d	2 b	92 ab
Cravo	2,4 d	0 b	23 c
Eucalipto	0,3 d	3 b	17 c
Gengibre	18,3 cd	97 a	100 a
Limão	86,0 b	70 a	100 a
Tangerina	46,3 bc	77 a	100 a
Média	39,0	38	72
Desvio padrão	55,5	42,9	34,9

Médias seguidas da mesma letra, na coluna, em cada dose, não diferem pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Fonte: produção do próprio autor, 2016.

Tabela 18 - Dose efetiva mediana ( $ED_{50}$ ;  $\mu\text{L L}^{-1}$ ), equações de regressão e coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de óleos essenciais de alecrim (*Rosmarinus officinalis*), canela (*Cinnamomum zeylacium*), citronela (*Cymbopogon winterianus*), eucalipto (*Corymbia citriodora*) e limão (*Citrus limonium*), para a inibição *in vitro* do crescimento micelial de *Penicillium expansum* Link.

Óleos essenciais	$ED_{50}$ ( $\mu\text{L L}^{-1}$ )	Equações de Regressão	$R^2$
Alecrim	664,3	$y = 12,4 + 0,057 x$	0,86
Canela	35,6	$y = 95,75 (1 - e^{-0,021x})$	0,90
Citronela	9,8	$y = 86,32 (1 - e^{-0,088x})$	0,84
Eucalipto	54,9	$y = 98,90 (1 - e^{-0,013x})$	0,90
Limão	189,7	$y = 20,46 + 0,15x + 0,00005x^2$	0,84

Fonte: produção do próprio autor, 2016.

### 3.4.3 Efeito dos óleos essenciais sobre o crescimento de *Penicillium expansum* *in vivo*

Maçãs ‘Fuji’ tratadas com diferentes óleos essenciais apresentaram menor diâmetro de lesão de mofo-azul que aquelas não tratadas, porém, o efeito dos óleos variou conforme a dose utilizada, dias de tratamento e data de avaliação.

### 3.4.3.1 Efeito do tratamento por 30 dias

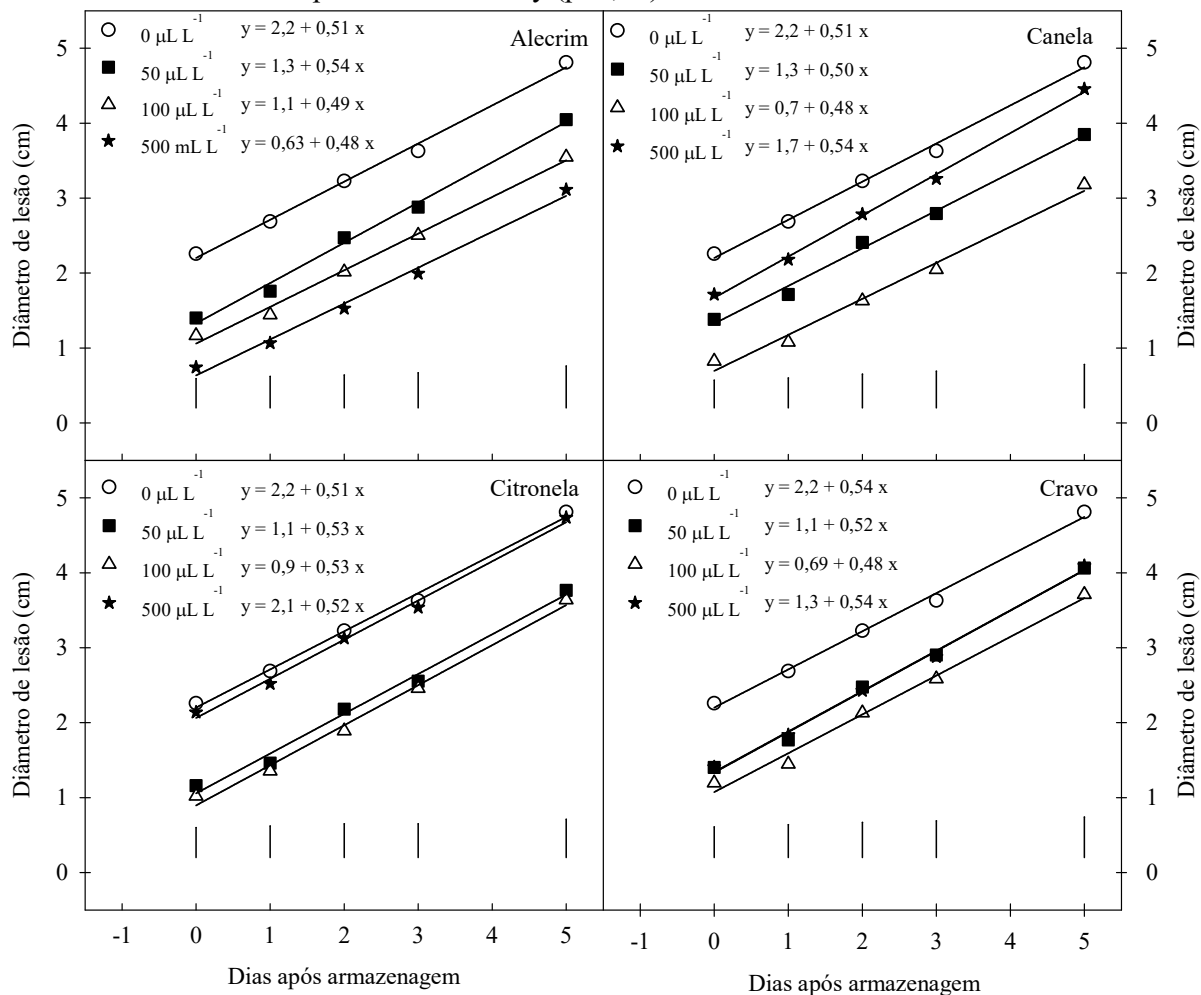
O aumento da dose do óleo essencial de alecrim diminuiu o diâmetro de lesão nos frutos, tanto no tratamento por 30 dias quanto por 2 dias (Figuras 3 e 5). Na avaliação realizada na saída da câmara (dia 0), a redução do crescimento de *P. expansum* nos frutos tratados por 30 dias com as doses de 50, 100 e 500  $\mu\text{L L}^{-1}$  do óleo essencial de alecrim foi de 38%, 48% e 67%, respectivamente. Após 5 dias em temperatura ambiente, ainda se observava maior inibição no crescimento do fungo nas maiores doses do óleo, e estas eram de 16%, 26% e 35% nas doses de 50, 100 e 500  $\mu\text{L L}^{-1}$ , respectivamente. Observou-se que o tratamento com a dose mais alta (500  $\mu\text{L L}^{-1}$ ) do óleo essencial de limão não reduziu o crescimento de *P. expansum* nas avaliações realizadas aos 0, 3 e 5 dias após o armazenamento refrigerado (Figura 6), sendo a dose de 100  $\mu\text{L L}^{-1}$  a que proporcionou a maior inibição do crescimento do fungo (58,2% no dia 0 e 27,4% aos 5 dias em temperatura ambiente). Efeito similar foi observado no tratamento com os óleos de canela, citronela, eucalipto, gengibre e tangerina, onde a dose de 500  $\mu\text{L L}^{-1}$  apresentou menor efeito na redução do crescimento de *P. expansum* (Figuras 3 e 4). Entretanto, apesar do efeito menos evidente do tratamento com a dose mais alta dos óleos de eucalipto, canela e gengibre, os frutos apresentavam menor diâmetro de lesão do que aqueles não tratados (Figuras 3, 4 e 5), diferentemente dos óleos de limão, citronela e tangerina, em que a dose de 500  $\mu\text{L L}^{-1}$  não diferiu do controle (Figuras 3 e 4).

O diâmetro de lesão nos frutos tratados com óleo de citronela nas doses de 50  $\mu\text{L L}^{-1}$  e 100  $\mu\text{L L}^{-1}$  não diferiram entre si, mas foi menor do que no controle (Figura 3), observando-se uma inibição da lesão causada pelo fungo, para ambas as doses, em torno de 50% na saída da câmara, e de pouco mais 20% aos cinco dias de exposição dos frutos em temperatura ambiente.

O tratamento com óleo essencial de cravo reduziu o diâmetro de lesão de mofo-azul, todavia, não se observou diferença significativa entre as doses (50, 100 e 500  $\mu\text{L L}^{-1}$ ) em todas as datas de avaliação (0, 1, 2, 3 e 5 dias após o armazenamento refrigerado) (Figura 3).

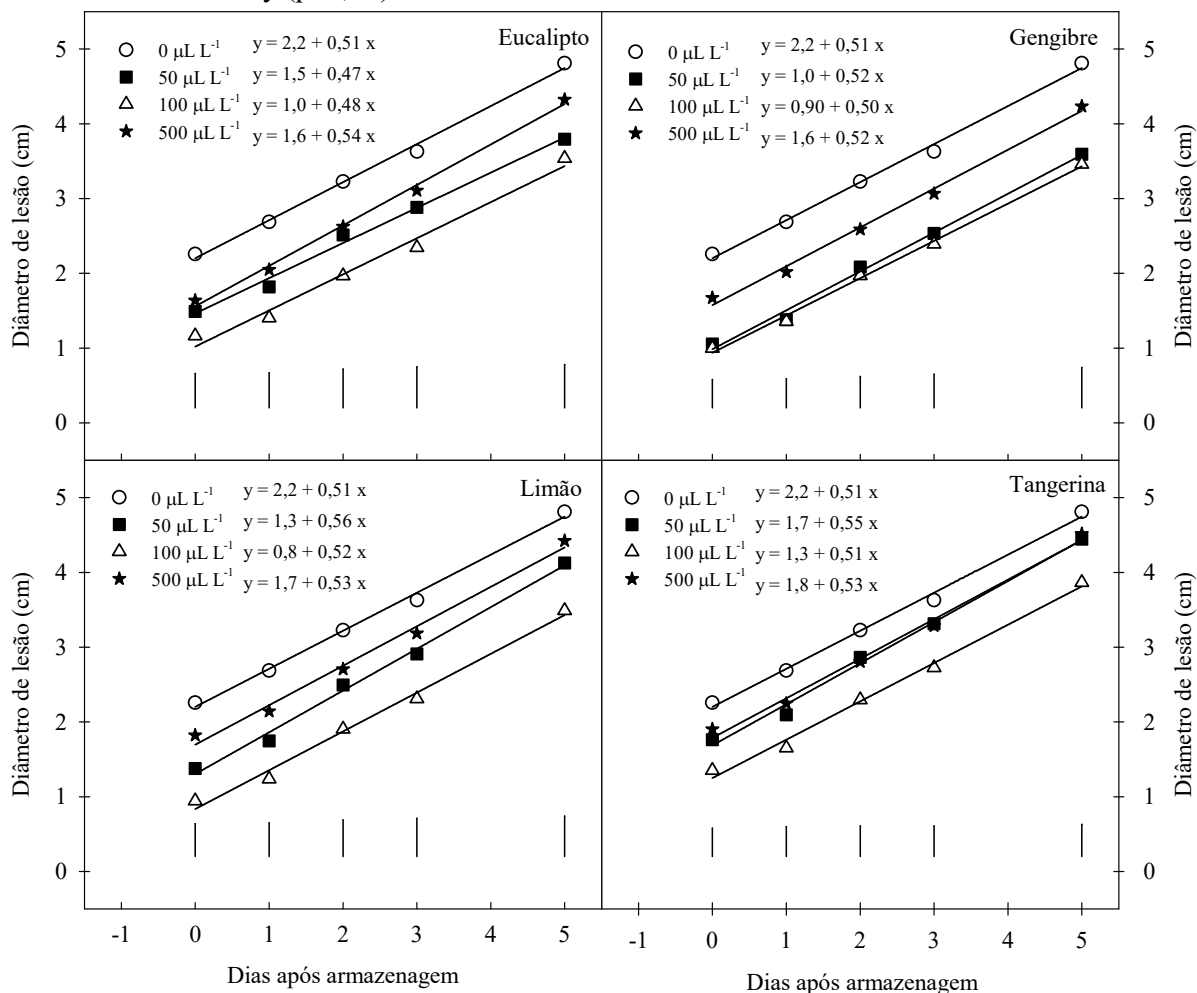
Houve inibição do crescimento *in vivo* de *P. expansum* de aproximadamente 50% nos frutos tratados por 30 dias com a dose de 100  $\mu\text{L L}^{-1}$  de todos os óleos na saída da câmara, e em torno de 20% após cinco dias em temperatura ambiente, exceto nos frutos tratados com óleo de canela, na mesma dose, em que a inibição foi de 64% e 34% nos dias 0 e 5, respectivamente.

Figura 3 - Diâmetro de lesão de mofo-azul (*Penicillium expansum* Link.) em maçãs 'Fuji' tratadas com 0, 50, 100 e 500  $\mu\text{L L}^{-1}$  de óleos essenciais de alecrim, canela, citronela e cravo, após 30 dias de armazenamento refrigerado na presença dos óleos essenciais ( $0\pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$  UR  $90\pm 2\%$ ), mais cinco dias à temperatura ambiente sem óleos essenciais ( $23\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$  UR  $70\pm 5\%$ ). Diâmetro de lesão avaliado aos 0, 1, 2, 3 e 5 dias após o armazenamento refrigerado. Barras verticais indicam a diferença mínima significativa entre as médias das diferentes doses pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).



Fonte: produção do próprio autor, 2016.

Figura 4 - Diâmetro de lesão de mofo-azul (*Penicillium expansum* Link.) em maçãs 'Fuji' tratadas com 0, 50, 100 e 500  $\mu\text{L L}^{-1}$  de óleos essenciais de eucalipto, gengibre, limão e tangerina, após 30 dias de armazenamento refrigerado na presença dos óleos essenciais ( $0\pm 0,5^\circ\text{C UR } 90\pm 2\%$ ) mais cinco dias à temperatura ambiente sem óleos essenciais ( $23\pm 4^\circ\text{C UR } 70\pm 5\%$ ). Diâmetro de lesão avaliado aos 0, 1, 2, 3 e 5 dias após o armazenamento refrigerado. Barras verticais indicam a diferença mínima significativa entre as médias das diferentes doses pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).



Fonte: produção do próprio autor, 2016.

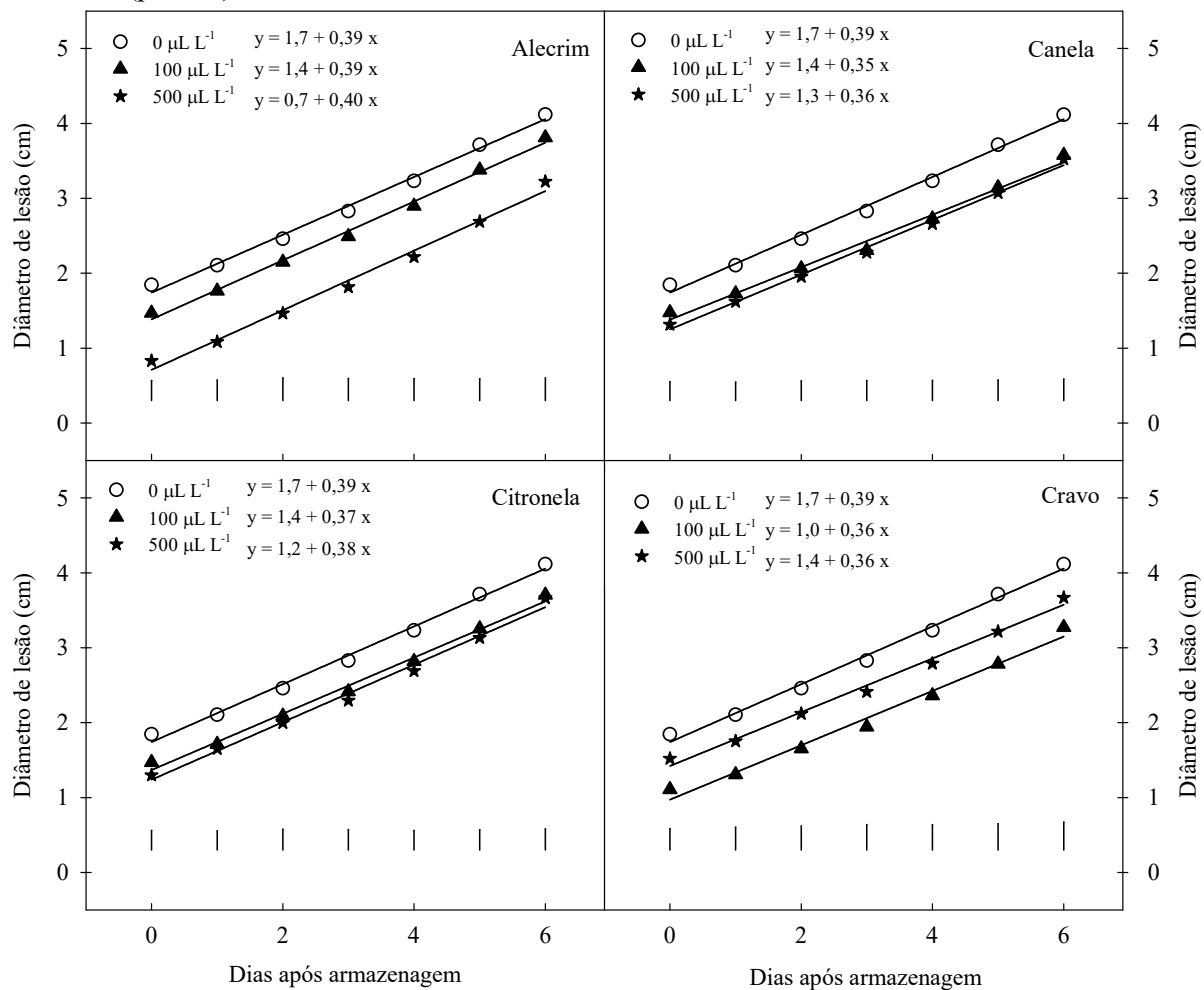
### 3.4.3.2 Efeito do tratamento por 2 dias

Nos frutos tratados com óleo de alecrim por 2 dias, a inibição no crescimento de *P. expansum* foi de 20% e 55% para as doses de 100 e 500  $\mu\text{L L}^{-1}$ , respectivamente, na saída da câmara. Após 6 dias em temperatura ambiente, a inibição do crescimento do fungo reduziu para 7% e 22%, nas respectivas doses. Observou-se que o aumento da dose do óleo essencial de limão proporcionou um menor diâmetro de lesão nos frutos tratados por 2 dias (Figura 6), levando a uma inibição de 13,5 e 31,5% para as doses de 100 e 500  $\mu\text{L L}^{-1}$ , respectivamente, na avaliação realizada na saída da câmara.

A dose de 500  $\mu\text{L L}^{-1}$  do óleo de cravo foi menos eficiente na redução do diâmetro de lesão de mofo-azul do que a dose de 100  $\mu\text{L L}^{-1}$ , entretanto, apesar do efeito menos evidente da dose mais alta, estes tiveram menor diâmetro de lesão do que frutos controle (Figuras 5).

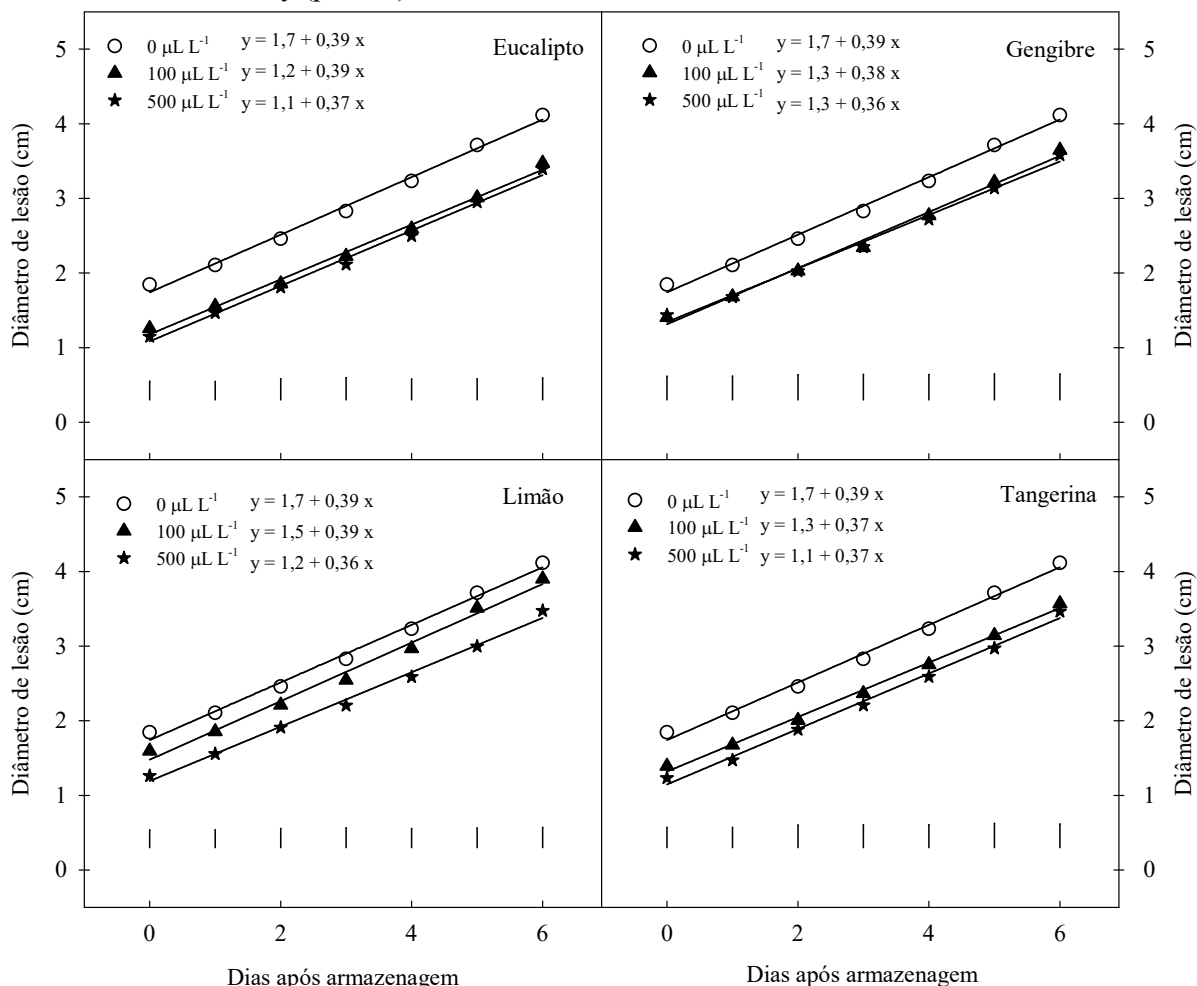
O tratamento com os óleos essenciais de canela, citronela, eucalipto, gengibre e tangerina reduziram o diâmetro de lesão de mofo-azul, todavia, não se observou diferença significativa entre as doses (100 e 500  $\mu\text{L L}^{-1}$ ) em todas as datas de avaliação (0, 1, 2, 3, 4, 5 e 6 dias após o armazenamento refrigerado) (Figuras 5 e 6).

Figura 5 - Diâmetro de lesão de mofo-azul (*Penicillium expansum* Link.) em maçãs 'Fuji' tratadas com 0, 100 e 500  $\mu\text{L L}^{-1}$  de óleos essenciais de alecrim, canela, citronela e cravo, após 45 dias de armazenamento refrigerado ( $0\pm 0,5^\circ\text{C}$  URA=95%) (dois dias na presença dos óleos) mais seis dias à temperatura ambiente ( $23\pm 4^\circ\text{C}$  UR  $70\pm 5\%$ ). Barras verticais indicam a diferença mínima significativa entre as médias das diferentes doses pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).



Fonte: produção do próprio autor, 2016.

Figura 6 - Diâmetro de lesão de mofo-azul (*Penicillium expansum* Link.) em maçãs 'Fuji' tratadas com 0, 100 e 500  $\mu\text{L L}^{-1}$  de óleos essenciais de eucalipto, gengibre, limão e tangerina, após 45 dias de armazenamento refrigerado ( $0\pm 1^\circ\text{C}$  UR  $90\pm 2\%$ ) (dois dias na presença dos óleos) mais seis dias à temperatura ambiente ( $23\pm 4^\circ\text{C}$  UR  $70\pm 5\%$ ). Barras verticais indicam a diferença mínima significativa entre as médias dos diferentes tratamentos pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).



Fonte: produção do próprio autor, 2016.

Para todos os óleos, doses e dias de tratamento, o crescimento das lesões ao longo dos dias em temperatura ambiente foi linear e não se observou diferença na taxa diária de crescimento das podridões em cada óleo entre as diferentes doses (coeficiente angular da reta não diferiu a  $p < 0,05$ ) (Figuras 3, 4, 5 e 6). A taxa de crescimento do fungo variou de 0,48 a 0,54 cm por dia para os óleos de alecrim, canela e cravo no tratamento por 30 dias (Figuras 3 e 4). Já para os óleos de citronela, eucalipto, gengibre, limão e tangerina, também tratados por 30 dias, a taxa de crescimento diária foi de 0,51 a 0,53; 0,47 a 0,54; 0,50 a 0,52; 0,51 a 0,56; 0,51 a 0,55 cm, respectivamente (Figuras 3 e 4). Quando os frutos foram tratados por dois dias, a taxa diária de crescimento variou de 0,37 a 0,39 cm para os óleos essenciais de citronela, eucalipto e tangerina (Figuras 5 e 6). Os óleos de cravo, gengibre e limão tiveram taxa de crescimento diário entre 0,36 e 0,39, enquanto que, para os óleos de alecrim e canela a taxa de crescimento variou entre 0,39 a 0,40 e 0,35 a 0,39 cm por dia, respectivamente (Figuras 5 e 6).

### 3.4.4 Efeito dos óleos essenciais sobre a qualidade pós-colheita dos frutos

O tratamento com as diferentes doses de óleos essenciais não afetou a maioria das variáveis analisadas em maçãs 'Fuji', tanto no tratamento por 30 dias quanto por 2 dias ( $p < 0,05$ ) (dados não apresentados). Os frutos que ficaram por 30 dias em contato com os óleos essenciais apresentavam firmeza média de 62 N e os frutos tratados por 2 dias apresentavam firmeza média de 67 N. O teor de sólidos solúveis variou de 13,3 a 13,9 em ambos os tempos de exposição aos óleos. A acidez titulável média nos frutos tratados com os óleos essenciais por 30 dias foi de 0,115% e os tratados por 2 dias foi de 0,144%. Os valores médios de ângulo *hue* nos frutos tratados com os óleos essenciais por 30 e 2 dias foi de 99 e 95,7, respectivamente (dados não apresentados).

## 3.5 DISCUSSÃO

### 3.5.1 Composição dos óleos essenciais

Diversos trabalhos têm demonstrado que óleos essenciais possuem uma complexa composição química, representada basicamente por hidrocarbonetos (terpenos e terpenoides) e compostos fenólicos (CHAIBUB et al., 2013; TAO; JIA; ZHOU, 2014; MOGHADDAM et al., 2015). Nos óleos essenciais analisados neste trabalho, identificou-se 5 a 23 compostos nos óleos de cravo e citronela, respectivamente. Castro et al. (2007) identificou 15 compostos no óleo essencial de citronela (*Cymbopogon nardus*), sendo citronelal, geraniol e citronelol os compostos majoritários, representando 37%, 25% e 11% da sua composição, respectivamente. Os mesmos compostos foram identificados como os principais componentes no óleo de citronela utilizado nestes experimentos, em proporções muito semelhantes àquelas encontradas por Castro et al. (2007) (36,2; 18,9; 12,8, respectivamente), com aproximadamente 60% de terpenoides e 40% de terpenos.

Bomfim et al. (2015) identificaram 24 compostos no óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), sendo eucaliptol, cânfora e  $\alpha$ -pineno os principais componentes, com concentrações relativas de 52,2; 15,2 e 12,4%, respectivamente. Neste estudo, identificou-se 18 compostos no óleo essencial de alecrim, entretanto, com os mesmos compostos majoritários e concentrações relativas semelhantes àquelas identificadas por Bomfim et al. (2015).

Sharma e Tripathi (2008) identificaram que 84% da composição do óleo essencial de *Citrus sinensis* (L.) era de limoneno, assim como o observado no óleo essencial de limão e tangerina neste estudo. Além disso, nos óleos essenciais de tangerina e limão se observou apenas hidrocarbonetos monoterpênicos na composição dos óleos, entretanto nos óleos essenciais de cravo-da-índia e canela os compostos fenólicos representaram 87% da sua composição. Bakkali et al. (2008) também citam que óleos essenciais de cravo-da-índia, canela e noz-moscada podem ter na sua composição principalmente compostos fenólicos. Estes autores observaram que cinamaldeído é o composto fenólico majoritário no óleo essencial de canela. Entretanto, o óleo essencial de canela utilizado nestes experimentos apresentou mais de 80% de eugenol e menos de 1% de cinamaldeído na sua composição. Alguns trabalhos têm destacado os fatores que podem influenciar na composição de óleos essenciais, sendo estes o método de extração (FISHER; PHILLIPS, 2008; FILIPPIS, 2001), fatores climáticos e fatores agrônômicos, como, fertilização, irrigação e fase de desenvolvimento da planta no momento da extração (PAVIANI, 2004; MASOTTI et al., 2003), bem como o órgão da planta utilizado para a extração (raízes, frutos, folhas ou caule) (VARUGHESE et al., 2016).

É importante destacar que a composição de todos os óleos essenciais analisados neste estudo apresentou de um a três compostos majoritários e diversos compostos com concentrações iguais ou inferiores a 1% (Tabelas 15 e 16). Alguns autores têm descrito a eficiência de alguns compostos isolados a partir de óleos essenciais de diferentes espécies de planta para o controle de fungos, como allyl-isothiocyanate (MARI et al., 2002), octanal (TAO; JIA; ZHOU, 2014), trans-2-hexanal (NERI; MARI; BRIGATI, 2006), eugenol, cinamaldeído, carvacrol (SUM et al., 2014),  $\alpha$ -pineno (RÍOS et al., 2003), entre outros, que são compostos majoritários em óleos essenciais de diversas espécies. Entretanto, alguns autores citam que os diversos compostos presentes em óleos essenciais podem

apresentar sinergismo no controle de microrganismo (RÍOS et al., 2003; BAKKALI et al., 2008; KUNDU et al., 2013a). Possivelmente, a atividade dos compostos majoritários seja articulada por moléculas minoritárias (HOET et al., 2006). Muitos destes compostos minoritários são responsáveis pela definição de aroma, densidade, textura, cor dos óleos, mas, também são responsáveis por características importantes no controle de microrganismo, como penetração na célula, atração lipofílica e hidrofílica, fixação na parede e membrana celulares e distribuição dos compostos com ação fungicida ou fungistática na célula fúngica (BAKKALI et al., 2008).

### 3.5.2 Experimentos *in vitro*

Todos os óleos essenciais testados apresentaram efeito redutor no crescimento de *P. expansum*, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, dependendo da dose utilizada e tempo de exposição ao óleo. Para o óleo de alecrim observou-se melhoria do efeito redutor de crescimento com o aumento da dose, tanto *in vivo*, quanto *in vitro*, entretanto este óleo essencial foi o que apresentou a maior ED<sub>50</sub> entre os analisados. BOMFIM et al. (2015) relataram efeito fungitóxico do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L., 150 µg mL<sup>-1</sup>) sobre o crescimento *in vitro* de *Fusarium verticillioides*, além da inibição na produção de micotoxina (fumonisins) pelo fungo.

Os óleos essenciais de canela, capim-limão, cravo-da-índia e eucalipto reduziram em mais de 30% o crescimento *in vitro* do fungo *Colletotrichum gloesporioides*, na dose de 200 µL L<sup>-1</sup> (LORENZETTI et al., 2011). Entretanto, quando os autores utilizaram a dose de 1.000 µL L<sup>-1</sup>, o efeito dos óleos sobre o fungo foi melhorado e a redução no crescimento do fungo atingiu 100% para os óleos de canela, capim-limão e cravo-da-índia, e 71% para o óleo de eucalipto (LORENZETTI et al., 2011). Neste estudo, observou-se que os óleos de canela, cravo-da-índia, citronela e eucalipto inibiram em torno de 80% o crescimento de *P. expansum* a uma dose menor (100 µL L<sup>-1</sup>) (Figura 1) que a utilizada por Lorenzetti et al. (2011) para *C. gloesporioides*, e quando se utilizou 1.000 µL L<sup>-1</sup>, a inibição de *P. expansum* foi de 100% para os respectivos óleos, concordando com os resultados de Lorenzetti et al. (2011) em *C. gloesporioides*. Além disso, a ED<sub>50</sub> estimada para os óleos de canela, eucalipto e citronela para o crescimento de *P. expansum* foram os mais baixos entre os óleos testados neste trabalho (Tabela 18). Kundu et al. (2013a) descrevem que óleos essenciais compostos principalmente por terpenoides podem ter uma maior atividade antifúngica. Entretanto, não é possível fazer essa relação com os óleos estudados neste trabalho, pois, apesar dos óleos de eucalipto e citronela terem composição principalmente de terpenoides, o óleo de canela tem 87% de fenilpropanoides. Além disso, o óleo de alecrim, cuja composição é de 66,4% de terpenoides apresentou a maior ED<sub>50</sub> dentre os óleos essenciais analisados (Tabelas 15 e 18).

Tao, Jia e Zhou (2014) observaram efeito inibitório do óleo essencial de *Citrus reticulata* sobre o crescimento *in vitro* de *P. italicum* e *P. digitatum* com as doses de 320 e 1.250 µL L<sup>-1</sup>, respectivamente. Entretanto, a inibição total de crescimento (100%) de *P. italicum* e *P. digitatum* só ocorreu em doses elevadas (2.500 µL L<sup>-1</sup> e 40.000 µL L<sup>-1</sup>, respectivamente). No presente estudo, a inibição do crescimento *in vitro* de *P. expansum* pelos óleos essenciais extraídos de espécies cítricas, limão e tangerina, foi de 44% e 35%, respectivamente, na dose de 1.000 µL L<sup>-1</sup>. Possivelmente, os melhores resultados obtidos por Tao, Jia e Zhou (2014) na inibição do crescimento de espécies de *Penicillium* com o uso de óleo essencial de espécies cítricas estejam relacionados a maiores doses utilizadas do que as deste trabalho. Todavia, o efeito diferencial também pode estar relacionado a diferente sensibilidade das espécies fúngicas, bem como a diferença na composição dos óleos essenciais. Van Hung, Chi e Phi (2013) testaram uma série de óleos essenciais de diversas espécies cítricas (*Citrus sinensis*, *C. reticulata*, *C. autantifolia* e *C. grandis*) e observaram uma inibição que variou de 35 a 53% sobre o crescimento de *P. expansum*. O óleo essencial de *C. sinensis* demonstrou uma concentração mínima inibitória de 500 µL L<sup>-1</sup> sobre o crescimento do fungo *P. expansum* (SHARMA; TRIPATHI, 2006), todavia, a ED<sub>50</sub> para o crescimento de *P. italicum* foi de 5.407,5 µL L<sup>-1</sup> (JING et al., 2014), confirmando que as espécies de *Penicillium* parecem ter diferente sensibilidade as moléculas antifúngicas.



O óleo essencial extraído do rizoma de *Alpinia allughas* (Zingiberaceae) apresentou potencial efeito fungicida, demonstrado através da inibição do crescimento *in vitro* de diversos fungos fitopatogênicos (*Colletotricum falcatum*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotium* e *Sclerotium rolfsii*) (SETHI et al., 2016). Os autores identificaram diversos compostos com potencial atividade antifúngica no óleo essencial desta planta (SETHI et al., 2016). Neste estudo, observou-se que o óleo essencial de gengibre (Zingiberaceae) foi o menos efetivo na inibição do crescimento *in vitro* de *P. expansum*, reduzindo o crescimento do fungo em 43% e 20% com as doses de 1.000 e 100  $\mu\text{L L}^{-1}$ , respectivamente, aos 6 dias após o isolamento. Todavia, a inibição *in vivo* promovida pelo óleo essencial de gengibre por 2 dias, durante o armazenamento refrigerado, foi de 53,3, 55,8 e 25,9% com as doses de 50, 100 e 1.000  $\mu\text{L L}^{-1}$ , respectivamente, na saída da câmara.

### 3.5.3 Experimentos *in vivo*

Através de uma análise sensorial foi possível identificar que determinadas doses de alguns óleos essenciais modificaram o aroma de maçãs tratadas com óleos essenciais por 30 dias (dados não apresentados). Além disso, outros trabalhos apresentaram um tempo de volatilização de óleos essenciais entre 6 e 72 horas (MARI et al., 2002; PLOTTO; ROBERTS; ROBERTS, 2003; NERI et al., 2006). Portanto, se decidiu avaliar o efeito do tratamento por 2 dias com óleos essenciais.

Neste trabalho, observamos que o efeito inibitório de crescimento do fungo foi mais evidente *in vitro* do que *in vivo* para a maioria dos óleos essenciais, sendo que outros autores publicaram observações semelhantes a esta. Os óleos essenciais de tomilho, orégano e capim-limão aplicados por vaporização (500  $\mu\text{L L}^{-1}$ ) *in vitro* inibiram completamente o crescimento micelial de *Botrytis cinerea* e *Alternaria arborescens* (PLOTTO; ROBERTS; ROBERTS, 2003). Entretanto, quando os óleos foram aplicados em tomates não apresentaram efeito sobre o crescimento destes fungos (PLOTTO; ROBERTS; ROBERTS, 2003). Além disso, de acordo com os mesmos autores, foi observado fitotoxicidade nos frutos em decorrência da vaporização de 50  $\mu\text{L L}^{-1}$  dos óleos. Porém, a imersão dos frutos em emulsão dos óleos a 5.000 e 10.000  $\mu\text{L L}^{-1}$  reduziu o desenvolvimento de doenças nos frutos, entretanto, fitotoxicidade foi observada nos frutos tratados com a dose de 10.000  $\mu\text{L L}^{-1}$  (PLOTTO; ROBERTS; ROBERTS, 2003). Shao et al. (2015) relataram que a incorporação do óleo essencial de cravo no meio de cultura reduziu significativamente o crescimento *in vitro* de *P. digitatum*, e observaram extravasamento de líquido celular e alteração da morfologia de hifas do fungo. Porém, os autores não conseguiram reproduzir os mesmos resultados em frutos cítricos inoculados artificialmente com o fungo e imersos em 500, 1.000 ou 2.000  $\mu\text{L L}^{-1}$  de óleo essencial de cravo (SHAO et al., 2015). Carvacrol, trans-cinamaldeído e cinamaldeído, compostos majoritariamente encontrados nos óleos essenciais de cravo-da-índia, canela, orégano e tomilho, vaporizados em frutos de mirtilo, apresentaram atividade antimicrobiana sobre *Escherichia coli* e *Penicillium digitatum* (SUM et al., 2014). Porém, os efeitos foram mais substanciais na inibição do crescimento microbiano *in vitro*.

Apesar de diversos trabalhos demonstrarem efeito inibitório de óleos essenciais de diversas espécies vegetais sobre o crescimento de diferentes espécies de fungos, efeito de inibição moderada ou até de estímulo do crescimento dos fungos tem sido observado. Droby et al. (2008) observaram que a dose de 20.000  $\mu\text{L L}^{-1}$  óleos essenciais de diferentes espécies de citros (tangerina, limão, toranja e laranja) estimularam a germinação de esporos dos fungos *P. italicum* e *P. digitatum*, e a dose de 40.000  $\mu\text{L L}^{-1}$  do óleo essencial de toranja demonstrou atividade anti-fúngica moderada sobre *P. digitatum*. Porém, observa-se claramente que o efeito dos óleos essenciais é dependente da composição do óleo essencial, dose, espécie microbiana, tempo e forma de tratamento (imersão ou volatilização) (DROBY et al., 2008; WANG et al., 2012).

Os mecanismos de ação antimicrobiana de óleos essenciais não são completamente compreendidos, mas possíveis mecanismos têm sido propostos em diferentes trabalhos. Alguns autores dizem que a característica lipofílica dos óleos permite a expansão da membrana plasmática das células microbianas, aumento da fluidez e permeabilidade de membrana, inibição da respiração celular, alteração do processo de transporte de íons e extravasamento de conteúdos celulares (KHAN

et al., 2010; FADLI et al., 2012). Outros autores observaram alteração da morfologia de células e bloqueio do crescimento celular (TAO; JIA; ZHOU, 2014). Jimenez-Del Rio e Velez-Pardo (2004) descrevem que óleos essenciais conseguem penetrar nas células devido o aumento da permeabilidade de membranas e causam danos, principalmente, na membrana das mitocôndrias. As mitocôndrias, através da mudança no fluxo de elétrons da cadeia de transporte, produzem radicais livre, os quais oxidam e danificam lipídeos, proteínas e DNA. Entretanto, alguns compostos fenólicos ou terpenoides presentes na composição dos óleos essenciais sofrem oxidação devido o contato com estes radicais livres, produzindo radicais fenoxi muito reativos, os quais podem causar danos ainda maiores as células microbianas (JIMENEZ-DEL RIO; VELEZ-PARDO, 2004; BAKKALI et al., 2008). Quando moléculas antioxidantes presentes nos óleos essenciais, como compostos fenólicos e terpenoides, interagem com as formas reativas de oxigênio, estas são convertidas a pró-oxidantes. Pró-oxidantes têm capacidade de oxidar lipídeos, proteínas e DNA, podendo causar severos danos a diversas organelas de células de microrganismos, além de comprometer toda a defesa antioxidante da célula microbiana (BAKKALI et al., 2005; 2006). Apesar de diversos trabalhos relatarem o efeito dos óleos diretamente sobre os microrganismos, alguns autores têm observado que óleos essenciais podem agir como indutores de resistência. Pereira et al. (2012) observaram aumento da atividade das enzimas peroxidase e quitinase até 336 horas após a pulverização de cafeeiros com  $1.000 \mu\text{L L}^{-1}$  do óleo essencial de citronela, promovendo a redução no crescimento de *Hemileia vastatrix* e *Cercospora coffeicola* de 47 e 29%, respectivamente. Shao et al. (2015) observaram aumento das enzimas de defesa quitinase e fenilalanina amônia-liase em citros devido a imersão dos frutos em solução com  $500 \mu\text{L L}^{-1}$  do óleo essencial de cravo-da-índia. Os autores atribuem a redução do diâmetro de lesões de mofo-verde (*P. digitatum*) ao efeito sinérgico de ação antimicrobiana e indutora de resistência do óleo essencial (SHAO et al., 2015).

### 3.5.4 Efeito sobre a qualidade dos frutos

Neste trabalho não se observou efeito das doses de diferentes óleos essenciais sobre os atributos físicos-químicos de maçãs ‘Fuji’ (*L*, *C*, *h*<sup>o</sup>, SS, AT e firmeza de polpa) (dados não apresentados). Entretanto, Sum et al. (2014) observaram que a aplicação de diferentes óleos essenciais manteve a firmeza de polpa de mirtilos. Porém, apesar de diversos resultados positivos sobre a inibição microbiana, poucos trabalhos têm mostrado o efeito dos óleos essenciais sobre os atributos de qualidade de diferentes espécies de frutos.

## 3.6 CONCLUSÕES

Os óleos essenciais de alecrim (*Rosmarinus officinalis*), canela (*Cinnamomum zeylacium*), citronela (*Cymbopogon winterianus*), limão (*Citrus limonium*), tangerina (*Citrus reticulata*), cravo-da-índia (*Syzigium aromaticum*), eucalipto (*Corymbia citriodora*) e gengibre (*Zingiber officinale*) utilizados neste trabalho são uma complexa mistura de várias moléculas em diferentes concentrações.

Todos os óleos reduziram o crescimento de *Penicillium expansum in vitro* e *in vivo*, com redução no número de esporos *in vitro*.

O óleo essencial de citronela foi o que apresentou maior toxicidade e o de alecrim menor toxicidade entre os analisados, com uma ED<sub>50</sub> variando de 9,8 a 664  $\mu\text{L L}^{-1}$ .

O efeito dos óleos essenciais na inibição do crescimento de *Penicillium expansum in vivo* foi menos evidente do que *in vitro* e tanto o tratamento por 30 dias quanto por 2 dias demonstraram eficiência no controle da podridão. Observou-se variação no efeito de dose conforme o óleo essencial analisado, sendo que, o aumento da dose não afeta, melhora ou piora o efeito do óleo sobre o crescimento de *P. expansum in vivo*.

Não se observou alteração dos atributos físicos-químicos de maçãs ‘Fuji’ tratadas com doses crescentes de diferentes óleos essenciais.

## 4 COMPOSTOS VOLÁTEIS EM MAÇÃS ‘FUJI’ TRATADAS COM ÓLEOS ESSENCIAIS

### 4.1 RESUMO

O perfil de compostos aromático em maçãs depende da cultivar, estágio de maturação na colheita, produção de etileno, tratamentos pós-colheita e ambiente de armazenamento, sendo principalmente composto por aldeídos, álcoois e ésteres. Óleos essenciais são substâncias com potencial para controle de diversos microrganismos causadores de doenças, entretanto, pouco se sabe sobre o seu efeito no perfil de compostos voláteis em maçãs. O objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil de compostos aromáticos em maçãs ‘Fuji’ tratadas com óleos essenciais de canela, cravo-da-índia, citronela e alecrim por imersão; e canela e citronela por vaporização. Os frutos foram tratados por imersão em solução contendo o óleo essencial diluído em surfactante ( $4.000 \mu\text{L L}^{-1}$ ) e água destilada em duas doses ( $2.000$  e  $4.000 \mu\text{L L}^{-1}$ ). Os frutos foram tratados por volatilização em recipiente hermeticamente fechado sob refrigeração com a dose de  $100 \mu\text{L L}^{-1}$ . Após 4 meses de armazenamento refrigerado ( $0\pm 0,5^\circ\text{C}/\text{UR } 90\pm 2\%$ ) mais 7 dias em condição ambiente ( $23\pm 0,5^\circ\text{C}/\text{UR } 80\pm 2\%$ ) foram analisados o perfil de compostos voláteis e a taxa de produção de etileno. Frutos tratados com óleo essencial de canela e cravo-da-índia por imersão apresentaram maior taxa de produção de etanol e acetaldeído, respectivamente, além de maior produção de etil e metil ésteres e maior taxa de produção de etileno em ambas as doses. Frutos tratados com  $4.000 \mu\text{L L}^{-1}$  do óleo essencial de citronela por imersão apresentaram maior taxa de produção de diversos aldeídos, combinado com menor produção de etileno. O tratamento com óleo de alecrim por imersão ( $4.000 \mu\text{L L}^{-1}$ ) e de citronela volatilizado reduziram a emissão de diversos ésteres, álcoois e aldeídos, entretanto, houve aumento de  $\alpha$ -pinene e eucaliptol com óleo de alecrim, e citronelal com óleo de citronela. Observou-se que o tratamento com óleos essenciais modificou o perfil de compostos voláteis de maçãs ‘Fuji’ após o armazenamento, identificando-se ésteres, álcoois, aldeídos, terpenos, terpenoides e fenilpropanoides, com taxa de emissão dependente do óleo essencial, dose e forma de tratamento (imersão ou volatilização).

Palavras-chave: *Malus domestica* Borkh. Compostos Voláteis. Pós-Colheita. Óleos Essenciais.

### 4.2 INTRODUÇÃO

Compostos voláteis são responsáveis pelas características do aroma em frutos. Estes são formados por substâncias como álcoois, aldeídos, cetonas e ésteres (UEDA et al., 2004). O aroma é um atributo que tem sido fortemente associado a qualidade dos frutos (PLOTTO; MCDANIEL; MATTHEIS, 2000; MARIN et al., 2009), e sua composição pode ser modificada por alterações ambientais e por práticas de manejo em pré e pós-colheita que resultem em mudanças nos processos fisiológicos e bioquímicos (ARVANITTOYANNIS; MAVROMATIS, 2009).

Mais de 300 compostos têm sido identificados em maçãs, principalmente aldeídos, álcoois e ésteres (MATTHEIS et al., 1991). A composição dos voláteis em maçãs depende da cultivar, estágio de maturação, produção de etileno e ambiente de armazenamento dos frutos (MATTHEIS et al., 1991; MATTHEIS; BUCHANAN; FELLMAN, 1995). Aldeídos, especialmente o hexanal e trans-2-hexenal, são os principais compostos voláteis encontrados em maçãs imaturas (MEHINAGIC et al., 2006), enquanto que frutos maduros são compostos principalmente por ésteres os quais parecem ter sua produção regulada pelo etileno (MATTHEIS et al., 1991). Os voláteis que mais contribuem para o aroma de maçãs ‘Fuji’ são os ésteres 2-metil butanoato de etila, acetato de 2-metil butila e acetato de hexila (ECHEVERÍA et al., 2004). Todavia, dentre os álcoois, o 1-butanol é um volátil desejável por conferir aroma doce e característico de maçã (MEHINAGIC et al., 2006).

Alguns compostos envolvidos na formação de aroma de frutos e outras plantas, principalmente os derivados da rota da lipoxigenase (LOX), também estão relacionados a resistência contra fungos (KYUNG; HAMILTON-KEMP; ARCHBOLD, 2006). Entretanto, Ulrich et al. (2011)

observam que a relação entre qualidade sensorial e propriedades de resistência a doenças não é tão simples, pois os genótipos de frutos mais suscetíveis a doenças estavam localizados em grupos de maior preferência pelos consumidores, e genótipos mais resistentes apresentavam menor qualidade sensorial. Todavia, alguns trabalhos têm mostrado que é possível a utilização exógena de óleos essenciais ou de compostos voláteis específicos para controle de microrganismos em frutos (ORABY; EL-BOROLLOS, 2013; SUM et al., 2014; TAO; JIA; ZHOU, 2014; BOMFIM et al., 2015). Patrignani et al. (2008) observaram que 2-(E)-hexenal e hexanal, dois aldeídos derivados da rota LOX, provocaram significativas mudanças na composição de ácidos graxos de *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis* e *Escherichia coli*. MARI et al. (2002) observaram que o vapor de alil-isotiocianato reduziu o tamanho de lesão de mofo-azul (*Penicillium expansum*) em peras ‘Conference’ e ‘Kaiser’. Carvacrol, cinamaldeído e trans-cinamaldeído, aplicados por vaporização, inibiram o crescimento de *E. coli* e *P. expansum* em mirtilos (SUM et al., 2014). Também diversos óleos essenciais têm mostrado efeito positivo no controle de fungos, como óleo essencial de citros no controle de *Penicillium italicum* e *P. digitatum* em frutas cítricas (TAO; JIA; ZHOU, 2014), óleos de tomilho, orégano e capim-limão no controle de *Botrytis cinerea*, *Alternaria arborescens* e *Rizopus stolonifer* em tomates (PLOTTO; ROBERTS; ROBERTS, 2003) e óleo de alecrim no controle de *Fusarium verticillioides in vitro* (BOMFIM et al., 2015).

Diversos trabalhos demonstram o efeito de compostos voláteis sobre o controle de microrganismos em diferentes culturas, entretanto, pouco se sabe sobre a modificação do perfil de compostos voláteis após o tratamento com óleos essenciais. Além disso, estes compostos podem apresentar aroma forte e variado, como descrito por The Good Scent Company (2016), onde hexanal possui aroma gramíneo, aldeído, fresco; carvacrol possui odor amadeirado, apimentado; cinamaldeído tem cheiro doce, apimentado, entre tantos outros. Considerando-se que os compostos voláteis presentes nos frutos podem interferir na preferência do consumidor (MATTHEIS; FELLMAN, 1999; ULRICH et al. 2011) é importante verificar se os óleos essenciais podem interferir no aroma destes. Portanto, o objetivo deste trabalho foi identificar o perfil de compostos voláteis após o armazenamento de maçãs ‘Fuji’ tratadas na colheita com óleos essenciais de canela (*Cinnamomum verum*), cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), citronela (*Cymbopogon winterianus*) e alecrim (*Rosmarinus officinalis*) por imersão; e canela (*Cinnamomum cassia*) e citronela (*Cymbopogon winterianus*) por vaporização.

#### 4.3 MATERIAL E MÉTODOS

As maçãs ‘Fuji’ foram colhidas no ponto ideal de maturação em um pomar comercial da cidade de Wenatchee, Estado de Washington, Estados Unidos. Após a colheita, os frutos foram transportados ao laboratório, onde as amostras foram homogeneizadas e divididas em bandejas com 18 frutos e montados dois experimentos.

No experimento 1, os frutos foram tratados por imersão em uma solução com surfactante e os óleos essenciais de canela (*Cinnamomum verum*), cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), citronela (*Cymbopogon winterianus*) ou alecrim (*Rosmarinus officinalis*). Foram utilizadas duas doses de óleo essencial, 2.000 e 4.000  $\mu\text{L L}^{-1}$  e uma bandeja de frutos por tratamento. Para o tratamento dos frutos foi preparada uma emulsão, misturando-se a quantidade de óleo necessária para atingir a dose de interesse em 4.000  $\mu\text{L L}^{-1}$  do surfactante Triton™ X-100 (Sigma-Aldrich®), e esta emulsão dissolvida em água destilada. Além do tratamento com os óleos essenciais, foram utilizados dois tratamentos controle, controle 1 em que os frutos foram imersos em solução de 4.000  $\mu\text{L L}^{-1}$  do surfactante Triton™ X-100 (Sigma-Aldrich®) sem óleo essencial, e controle 2 em que os frutos não foram submetidos a imersão. Após 3 minutos de imersão nas soluções com óleo essencial, os frutos permaneceram por 2 horas em temperatura ambiente até secarem e, então, foram armazenados em caixas de papelão (com capacidade para 18 kg) com saco plástico (polietileno de 8 micras padrão utilizado para comercialização de maçãs) sob refrigeração ( $0\pm 0,5^\circ\text{C}/\text{UR } 90\pm 2\%$ ) por 4 meses.

No experimento 2, os frutos foram tratados por vaporização em ambiente refrigerado por 72 horas com 100  $\mu\text{L L}^{-1}$  dos óleos essenciais de canela (*Cinnamomum cassia*) ou citronela

(*Cymbopogon winterianus*) em recipientes hermeticamente fechados com capacidade para 67 litros. O volume de óleo essencial necessário para atingir a concentração de interesse foi calculado pela seguinte fórmula:  $C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$ , onde,  $C_1$  é a concentração de interesse ( $100 \mu\text{L L}^{-1}$ );  $V_1$  é o volume livre no recipiente, obtido através da subtração do volume do recipiente (67 L) e o volume de frutos colocado no recipiente (kg);  $C_2$  é a concentração do óleo (100%) e  $V_2$  é o valor a ser calculado (x), que seria o volume de óleo necessário para atingir a concentração de interesse no interior do recipiente. O óleo essencial foi colocado em papel filtro Whatman® número 40 com 125 mm de diâmetro e este colado na parte superior do recipiente de tratamento dos frutos. Além do tratamento com os óleos essenciais, haviam dois tratamentos controle, controle 1 em que os frutos ficaram por 72 horas nos recipientes hermeticamente fechados com papel filtro umedecido com água destilada e o controle 2 em que os frutos ficaram apenas em ambiente refrigerado. Após o tempo de tratamento, antes da abertura dos recipientes, foi coletado uma amostra da atmosfera das câmaras de tratamento para análise dos compostos voláteis. Os recipientes de tratamento continham um septo onde foi conectada uma agulha e esta conectada a Tenax® trap. A velocidade do ar que passava através da Tenax® trap foi de  $100 \text{ mL min}^{-1}$ . O volume de amostra da atmosfera coletado foi de 50 e 250 mL para os recipientes com óleos essenciais e o controle, respectivamente. Após a abertura dos recipientes, os frutos foram armazenados em caixas de papelão (com capacidade para 18 kg) com saco plástico (polietileno de 8 micras padrão utilizado para comercialização de maçãs) sob refrigeração ( $0 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C/UR } 90 \pm 2\%$ ) por 4 meses.

Após o armazenamento refrigerado, seguido por 7 dias em condição ambiente ( $23 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C/UR } 80 \pm 2\%$ ), foram analisados a taxa de produção de etileno e o perfil de compostos voláteis dos frutos. Para estas análises, os frutos intactos foram acondicionados em jarras de vidro de 4 L (4 maçãs,  $\sim 1 \text{ kg}$ ) com um sistema de fluxo de ar dinâmico de  $6 \text{ L h}^{-1}$  e, então, foi coletado uma amostra de gás do interior de cada jarra a partir do septo de saída de ar.

Para a determinação da taxa de produção de etileno ( $\mu\text{mol kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) a amostra de gás do interior das jarras foi coletada com auxílio de uma seringa hipodérmica de 0,5 mL. As amostras foram injetadas em um cromatógrafo a gás (HP 5980, Agilent Technologies, Palo Alto, CA) equipado com metanador, detector de ionização de chama e coluna de vidro de 46 cm de comprimento por 0,32 cm de diâmetro contendo Paropak Q (Supelco Co., Bellefonte, PA). As temperaturas do forno, injetor e detector foram de 60, 100 e  $200 \text{ }^\circ\text{C}$ , respectivamente. Os fluxos de  $\text{N}_2$ ,  $\text{H}_2$  e ar foram de 0,5, 0,17 e  $3,3 \text{ mL s}^{-1}$ , respectivamente.

Para a coleta dos compostos voláteis, uma Tenax® trap [tubo de vidro de 11,5 cm de comprimento por 6 mm de diâmetro contendo 60 mm/180 mg de Tenax® (Supelco, Bellefonte, PA)] foi conectada às jarras de vidro com os frutos a partir do septo de saída de ar e esta a uma bomba de sucção e, então, aprisionados os compostos aromáticos no Tenax®. O fluxo de ar passava através da Tenax® trap a uma taxa de  $100 \text{ mL min}^{-1}$  e a amostra coletada da atmosfera das jarras variou de 250 a 350 mL, conforme o tratamento.

Para a análise dos compostos voláteis, as traps foram colocadas em um cromatógrafo a gás acoplado de um espectrofotômetro de massa Agilent Technologies 5977A MSD 7890B GC System. As traps foram dessorvidas termicamente (TDS3 e TDSA2, Gerstel, Linthicum, MD) a uma temperatura programada de  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  por 30 segundos, com um aumento de  $1 \text{ }^\circ\text{C}$  por segundo até  $250 \text{ }^\circ\text{C}$  e mantido por 360 segundos. Os compostos dessorvidos eram criogenicamente aprisionados à  $-130 \text{ }^\circ\text{C}$  (CIS-3, Gerstel) usando o Gerstel Maestro Global Analytical System, com nitrogênio líquido. Seguindo a transferência de compostos dessorvidos no TDS, a temperatura de crioaprisionamento aumentava  $10 \text{ }^\circ\text{C}$  por segundo até alcançar  $250 \text{ }^\circ\text{C}$  e era mantida por 120 segundos. Então, os compostos eram transferidos para o sistema Hewlett-Packard 5977A -7890B GC-MSD (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA) equipado com uma coluna DB-5MS (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) de 30 metros de comprimento por 0,25 mm de diâmetro interno com um filme de  $0,25 \mu\text{m}$  de espessura.

A temperatura inicial do forno ( $35 \text{ }^\circ\text{C}$ ) era mantida por 600 segundos, aumentando  $0,17 \text{ }^\circ\text{C}$  por segundo até que atingisse  $250 \text{ }^\circ\text{C}$ , então mantida por 180 segundos. A velocidade linear do gás de arraste Hélio foi de  $33,9 \text{ cm s}^{-1}$ . O programa utilizado para a análise dos dados foi Hewlett-Packard Enhanced Chemstation (G1701FA Versão F.01.01.2317; Agilent Technologies, Santa Clara, CA).

Utilizando os programas MSD Chemstation Data Analysis (Agilent Technologies, Santa Clara, CA), AMDIS GC/MS Analysis e National Institute of Standards and Technology MS Search 2.0 (NIST, Gaithersburg, MD) os compostos foram identificados pela comparação do tempo de retenção e espectro das amostras com um padrão e quantificados ( $\text{ng kg}^{-1} \text{L}^{-1}$ ) pela comparação entre a área dos picos das amostras com este mesmo padrão. Alguns compostos foram identificados pela comparação dos índices Kovats com os da biblioteca NIST MS Search 2.0 e quantificados através da sua área relativa (%) em cada tratamento. Os padrões foram obtidos da Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI) exceto 1-propanol (J.T. Baker, Center Valley, PA), etil acetato (Fischer Scientific, Pittsburgh, PA), e etanol (Decon Laboratories, King of Prussia, PA).

Cada jarra com frutos representava uma repetição. Foram utilizadas 3 repetições por tratamento em um delineamento inteiramente casualizado. Os dados de compostos voláteis foram submetidos à análise de *clusters* e *heatmaps* foram gerados utilizando-se Metaboanalyst (Xia et al., 2015) para os compostos com identificação confirmada por co-eluição com os padrões autênticos (dados em  $\text{ng kg}^{-1} \text{L}^{-1}$ ) e também para aqueles identificados através da comparação do índice Kovats (dados em percentual). Antes de gerar os *heatmaps*, a média de cada composto em cada tratamento foi calculada a partir das três repetições e esta foi centralizada e dividida pela raiz quadrada do desvio padrão de cada composto (*pareto scaling*). A análise de *clusters* foi realizada pelo algoritmo de *clustering* de Ward e distância Euclidiana. Os *heatmaps* foram utilizados para descrever os resultados da análise de *clusters* onde o grau de resposta relativa foi representado por um gradiente de coloração conforme o nível dos compostos de baixo até elevado. Os compostos foram agrupados nos *heatmaps* conforme sua similaridade de resposta nos tratamentos.

Os resultados da taxa de produção de etileno foram submetidos à análise da variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) utilizando-se o programa SAS (Institute, Inc., Cary, NC).

#### 4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foi observado efeito diferencial das doses 2.000 e 4.000  $\mu\text{L L}^{-1}$  de cada óleo essencial sobre a taxa de produção de etileno. Portanto, para os frutos tratados por imersão apresentou-se a média das doses de cada óleo essencial e dos tratamentos controle 1 e 2 (Tabela 19).

O tratamento dos frutos com o óleo essencial de alecrim não afetou a taxa de produção de etileno ( $0,575 \mu\text{mol kg}^{-1} \text{h}^{-1}$ ), não diferindo da taxa de produção de etileno dos frutos controle 1 (imersos sem óleo essencial;  $0,505 \mu\text{mol kg}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) e 2 (sem imersão;  $0,615 \mu\text{mol kg}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) (Tabela 19). O tratamento com o óleo essencial de citronela promoveu redução da taxa de produção de etileno dos frutos ( $0,355 \mu\text{mol kg}^{-1} \text{h}^{-1}$ ). Rabbany e Mizutani (1996) observaram que maçãs tratadas com citronelal,  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -pinene e  $p$ -cimene tiveram reduzida taxa de produção de etileno devido uma redução nos níveis de ácido 1-carboxi-1-amino-ciclopropano (ACC) nos frutos. Todavia, os autores também observaram que a redução devido o tratamento com citronelal, principal componente do óleo essencial de citronela, foi mais acentuado que nos demais compostos. Pérez-Alfonso et al. (2012) observaram uma redução na taxa de produção de etileno em limões devido o aumento na dose de tratamento com carvacrol e timol, compostos majoritários nos óleos de orégano e tomilho, respectivamente. Portanto, observa-se que diversos componentes de óleos essenciais podem ter efeito redutor da produção de etileno nos frutos. Os frutos tratados por imersão com óleos essenciais de canela e cravo-da-índia tiveram as maiores taxas de produção de etileno ( $0,821$  e  $0,806 \mu\text{mol kg}^{-1} \text{h}^{-1}$ , respectivamente). Entretanto, Jhalegar, Sharma e Singh (2015) observaram redução na taxa de produção de etileno em citros devido o tratamento com  $600 \mu\text{L L}^{-1}$  do óleo essencial de cravo-da-índia. A discordância entre os resultados obtidos por estes autores e os obtidos no presente trabalho para óleo essencial de cravo-da-índia pode estar relacionado ao fato de serem avaliadas doses diferentes, bem como, a variação de composição que pode ocorrer entre óleos essenciais de mesma espécie (VARUGHESE et al., 2016).

Não se observou diferença estatística entre tratamentos na taxa de produção de etileno de maçãs ‘Fuji’ tratadas com óleo essencial por volatilização, apresentando taxa média de 0,411  $\mu\text{mol kg}^{-1} \text{h}^{-1}$  (Tabela 19).

Tabela 19- Taxa de produção de etileno ( $\mu\text{mol kg}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) de maçãs ‘Fuji’ tratadas por imersão em duas doses (2.000 e 4.000  $\mu\text{L L}^{-1}$ ) com os óleos essenciais de canela (*Cinnamomum verum*), cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), citronela (*Cymbopogon winterianus*), alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e dois tratamentos controle (controle 1 – frutos imersos em solução sem óleo essencial e controle 2 – frutos sem imersão); e tratadas por volatilização com a dose de 100  $\mu\text{L L}^{-1}$  dos óleos de canela (*Cinnamomum cassia*), citronela (*Cymbopogon winterianus*) e dois tratamentos controle (controle 1 – frutos mantidos em recipiente de tratamento sem óleo essencial e controle 2 – frutos mantidos sob refrigeração).

Óleo essencial	Método de tratamento	
	Imersão <sup>(1)</sup>	Volatilização
Controle 1	0,505 b <sup>(2)</sup>	0,436 a
Controle 2	0,615 b	0,456 a
Canela	0,821 a	0,396 a
Citronela	0,355 c	0,358 a
Cravo	0,806 a	-
Alecrim	0,575 b	-
Média	0,625	0,411
Desvio padrão	0,196	0,107

<sup>(1)</sup> Médias das doses de 2.000 e 4.000  $\mu\text{L L}^{-1}$  de cada óleo essencial.

<sup>(2)</sup> Médias seguidas por letras iguais na coluna, para cada método de tratamento, não diferem pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Fonte: produção do próprio autor, 2016.

Através da análise dos *heatmaps* é possível observar que o tratamento com óleos essenciais em pós-colheita, tanto volatilizado quanto por imersão, afetou a emissão de compostos voláteis após o armazenamento de maçãs ‘Fuji’ (Figuras 7, 8, 9 e 10). Observou-se que o simples fato de imergir os frutos em solução de surfactante ou mantê-los em ambiente hermético por 72 horas já causaram alterações na emissão de compostos aromáticos, pois observou-se diferença na composição de voláteis entre os tratamentos controle 1 e 2 (Figuras 7, 8, 9 e 10).

Os compostos voláteis emitidos de maçãs ‘Fuji’ tratadas com óleos essenciais por imersão foram diferentes quantitativamente e qualitativamente, em ambas as doses testadas, entretanto, alguns compostos foram emitidos em maior quantidade quando se utilizou a dose de 4.000  $\mu\text{L L}^{-1}$  (Figuras 7 e 8). Os frutos tratados por imersão com óleo essencial de canela e cravo-da-índia apresentaram uma maior taxa de emissão de etanol e acetaldeído, respectivamente. Além disso, observou-se que frutos tratados por imersão com estes óleos tiveram considerável aumento na produção de etil e metil ésteres, especialmente aqueles tratados com a maior dose do óleo de cravo-da-índia (Figura 7), combinado a uma maior taxa de produção de etileno nos frutos tratados com óleos de cravo-da-índia e canela (Tabela 19). Fellman et al. (2000) observaram que maçãs ‘Fuji’ produzem consideráveis quantidades de etanol e acetaldeído, especialmente em frutos colhidos com maturação avançada. Entretanto, Argenta et al. (2004) sugerem que, além da maturação avançada, frutos armazenados em ambiente com alto  $\text{CO}_2$  e baixo  $\text{O}_2$  podem ter maior taxa de emissão destes compostos devido a um início de metabolismo fermentativo. O aumento na produção de etanol e acetaldeído pelos frutos, após um início de metabolismo anaeróbico, tem como consequência o aumento na emissão de etil e metil ésteres (ARGENTA et al., 2004), além disso, o aumento na produção de etileno promove elevação na taxa de produção destes compostos por terem a síntese dependente de etileno (FAN; MATTHEIS; BUCHANAN, 1998; BANGERTH SONG; STREIF, 2012; BOTH et al., 2014). Portanto, a maior taxa de emissão de etanol e acetaldeído observada nos frutos tratados com os óleos de canela e cravo-da-índia pode estar associada a antecipação de senescência dos frutos, tendo em consideração que o tratamento com estes óleos essenciais proporcionou um aumento na taxa de

produção de etileno (Tabela 19), ou ainda, poderia estar relacionado a redução da troca gasosa entre a epiderme dos frutos e o ambiente externo, causando, possivelmente, uma redução dos níveis de O<sub>2</sub> e aumento do CO<sub>2</sub> interno do fruto.

A imersão dos frutos em óleo essencial de alecrim e citronela reduziu a produção de etanol e o óleo de alecrim também reduziu a produção de acetaldeído (Figura 7). Essa redução na síntese de etanol e acetaldeído em frutos tratados por imersão com óleo essencial de citronela pode estar relacionado a menor taxa de produção de etileno nestes frutos. Schaffer et al. (2007) observaram que o etileno intensifica a formação de álcoois. Além disso, Thewes et al. (2015), observou que a aplicação de 1-MCP, um potente inibidor da ação do etileno, reduziu fortemente a síntese de etanol e acetaldeído, em relação a frutos não tratados. Outros tratamentos pós-colheita, como aplicação de difenilamina (DPA), podem reduzir a produção de etanol e acetaldeído em maçãs 'Fuji', prevenindo a ocorrência de dano de CO<sub>2</sub> em maçãs 'Fuji' (ARGENTA et al., 2004).

Os frutos tratados por volatilização com o óleo essencial de citronela também apresentaram menor taxa de emissão de etanol, assim como no tratamento por imersão com este mesmo óleo. Todavia, diferentemente dos frutos tratados por imersão, a aplicação do óleo essencial por volatilização não apresentou efeito sobre a taxa de produção de etileno (Tabela 19), o que sugere que o óleo essencial de citronela reduziu a síntese de etanol por um mecanismo independente de etileno. Os frutos tratados por volatilização com óleo de canela tiveram uma elevada taxa de emissão de etanol, contudo, esta foi similar aos frutos do tratamento controle 1 (mantidos em recipiente hermético sem óleo essencial) o que refletiu em uma maior taxa de etil e metil ésteres no tratamento controle 1, mas não no tratamento com óleo de canela (Figura 9).

O tratamento por imersão com o óleo essencial de cravo-da-índia aumentou a emissão de alguns álcoois, como 1- e 2-propanol, 1- e 2- butanol, 2-metil-1-butanol e 2-metil-1-butanol. O óleo essencial de canela também promoveu uma maior emissão de álcoois como 2-propanol, 2-metil-1-propanol e 2-etil-1-hexanol, entretanto, todos os óleos essenciais reduziram a emissão de outros álcoois, como 1- e 2-butanol e 1-hexanol (Figura 7). Knee e Hatfield (1981) observaram que o aumento na liberação de álcoois (1- e 2-propanol; 1- e 2-butanol) leva a síntese de propil, butil e hexil ésteres. Portanto, pode-se relacionar que a maior taxa de emissão de álcoois devido o tratamento com os óleos de cravo-da-índia e canela levou ao aumento de produção da maioria dos propil, butil e hexil ésteres, especialmente na dose mais elevada do óleo essencial de cravo-da-índia (4.000 µL L<sup>-1</sup>), com exceção de propil propanoato em que a produção foi reduzida ou não alterada devido o tratamento por imersão com óleo essencial (Figura 7). O tratamento com óleo essencial de citronela também aumentou a produção de vários butil e hexil ésteres pelos frutos, entretanto os demais óleos não alteraram ou reduziram a produção destes compostos voláteis (Figura 7).

O tratamento dos frutos com o óleo essencial de citronela volatilizado reduziu a produção de grande parte dos ésteres, enquanto que o óleo de canela reduziu ou não alterou a produção da maioria deles, assim como da maioria dos álcoois (Figura 9).

Os frutos tratados com a dose mais alta (4.000 µL L<sup>-1</sup>) do óleo essencial de citronela apresentaram maior produção de alguns aldeídos (nonanal, octanal, decanal e hexanal). Os frutos tratados com o óleo essencial de canela tiveram taxa de produção destes aldeídos semelhante aos tratamentos controle 1 e 2 (frutos imersos em surfactantes ou sem imersão, respectivamente) (Figura 7). Os frutos tratados com o óleo essencial de alecrim na dose de 4.000 µL L<sup>-1</sup> apresentaram baixa taxa de produção de vários aldeídos identificados nas amostras (nonanal, octanal, decanal, hexanal, propanal e butanal), entretanto, este óleo na menor dose (2.000 µL L<sup>-1</sup>), assim como o óleo essencial de cravo-da-índia e canela, em ambas as doses, promoveram um aumento na produção dos aldeídos propanal e butanal. Mattheis et al. (1991) identificaram elevados níveis de aldeídos em frutos imaturos e nas primeiras semanas de armazenamento de maçãs 'Bisbee Delicious', entretanto, ao final do período de armazenamento refrigerado os compostos estavam em níveis muito baixos ou não detectáveis devido ao adiantado estágio de amadurecimento dos frutos. Thewes et al. (2015) observaram que maçãs 'Royal Gala' tratadas com 1-MCP, molécula que promove atraso substancial do amadurecimento de maçãs 'Gala', tiveram aumento na taxa de produção de aldeídos (acetaldeído, butanal, hexanal e 2-(E)-hexanal). Portanto, uma maior taxa de produção de vários aldeídos (Figura 7) associado a menor taxa de produção de etileno (Tabela 19), sugere que a dose mais alta (4.000 µL



L<sup>-1</sup>) do tratamento por imersão com o óleo essencial de citronela, possivelmente, tenha proporcionado uma desaceleração na taxa de amadurecimento de maçãs ‘Fuji’.

O mesmo comportamento não foi observado no tratamento dos frutos com o óleo de citronela volatilizado, pois observou-se maior produção de apenas dois aldeídos, hexanal e benzaldeído, enquanto que os demais aldeídos foram emitidos pelos frutos em uma taxa mais baixa (Figura 9), além disso, não se observou diferença na taxa de produção de etileno entre os tratamentos (Tabela 19).

Os principais compostos voláteis que compõem o aroma de maçãs são aldeídos, álcoois e ésteres (MATTHEIS et al., 1991; MATTHEIS; BUCHANAN; FELLMAN, 1995, ARGENTA et al., 2004; THEWES et al., 2015). Entretanto, neste trabalho se observou a presença de terpenos, terpenoides e fenilpropanoides nos frutos tratados com óleos essenciais, tanto por imersão quanto por volatilização (Figuras 7, 8, 9 e 10). Alguns autores têm relacionado a emissão de terpenos e fenilpropanoides pelas plantas à uma resposta de resistência das plantas à insetos e patógenos, tanto pelo ataque destes quanto pelo uso de produtos capazes de elicitar essa resposta (ZHANG et al., 2009; ARAGÚEZ et al., 2013; ALARCON et al., 2015). Contudo, devido a composição dos óleos essenciais, é possível que os compostos identificados sejam resíduos do tratamento nos frutos.

Observou-se que apenas os frutos tratados com o óleo essencial de citronela, volatilizado ou por imersão, emitiram consideráveis quantidade do terpenoide citronelal (Figuras 7 e 9) e do terpeno citronelol (Figuras 8 e 10). Alguns trabalhos têm demonstrado efeito positivo do óleo essencial de citronela, bem como do composto citronelal sobre o controle de diversos fungos, mesmo em quantidade muito baixas (WURYATMO; KLIEBER; SCOTT, 2003; PEREIRA et al., 2012; CHEN et al., 2014). Ortiz-Serrano; Gil (2010) observaram que tomates podem produzir citronelol em diferentes concentrações dependendo da cultivar e estágio de maturação, e relacionaram a produção deste a resistência à doenças nos frutos. Todavia, o composto identificado nas maçãs ‘Fuji’ deste trabalho parece ser resíduo do tratamento com o óleo essencial de citronela, pois citronelal e citronelol aparecem, além do geraniol, como os principais compostos identificados no óleo essencial de citronela, conforme observado no capítulo 3 (Tabela 15) e por Chen et al. (2014). Além disso, os frutos tratados por imersão com a dose mais elevada do óleo (4.000  $\mu\text{L L}^{-1}$ ) apresentaram maior quantidade destes compostos do que os tratados com a dose menor (2.000  $\mu\text{L L}^{-1}$ ) (Figuras 7, 8, 9 e 10) e identificou-se elevada quantidade de citronelal (Figura 11) e citronelol (Figura 12) no perfil de voláteis coletados a partir dos recipientes de tratamento com o óleo volatilizado. Os frutos tratados com o óleo essencial de citronela também emitiram elevada quantidade de  $\beta$ -pineno (Figura 8), este composto em conjunto com a maior taxa de emissão de citronelal e citronelol, possivelmente, refletiram em uma menor taxa de produção de etileno pelos frutos (0,355  $\mu\text{mol kg}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) (Tabela 19). Rabbani e Mizutani (1996) observaram que maçãs tratadas com citronelal, citronelol e  $\beta$ -pinene tiveram uma redução da síntese de ACC, o que ocasionou em menor taxa de produção de etileno pelos frutos.

Identificou-se nos frutos tratados com o óleo essencial de alecrim elevada quantidade do terpenoide eucaliptol e do terpeno  $\alpha$ -pineno, principalmente nos frutos tratados com 4.000  $\mu\text{L L}^{-1}$  do óleo essencial (Figura 7). Bomfim et al. (2015) identificaram que 12 e 52% do óleo essencial de alecrim é composto por  $\alpha$ -pineno e eucaliptol, respectivamente, e apresentou eficiência no controle de *Fusarium verticillioides*. Camiletti et al. (2014) identificaram 5,5 e 24,3% de  $\alpha$ -pineno e eucaliptol, respectivamente, no óleo essencial de alecrim, com efeito positivo do óleo no controle dos patógenos *Penicillium sp.* e *Aspergillus flavus*.

Eugenol e cinamaldeído foram os fenilpropanoides identificados nos frutos tratados por imersão com o óleo essencial de canela, e eugenol nos frutos tratados por imersão com óleo essencial de cravo-da-índia (Figuras 7 e 8), observando uma maior quantidade destes voláteis na dose mais alta dos óleos. Quando o tratamento foi realizado com o óleo essencial de canela por volatilização, cinamaldeído foi identificado nas amostras coletadas após o armazenamento dos frutos (Figura 9), mas não eugenol (Figura 10), apesar de ambos terem disso identificados nas análises realizadas a partir dos recipientes de tratamento de maçãs com o óleo essencial volatilizado (Figuras 11 e 12).

Cheng et al. (2004) destacaram que cinamaldeído e eugenol são os principais componentes do óleo essencial de canela e apresentam forte ação inseticida e fungicida. Todavia, embora alguns

autores tenham observado que algumas variedades de morango têm capacidade de produzir eugenol com importante função de proteção dos frutos e contribuindo para o aroma dos mesmos (Zorrilla-Fontanesi et al., 2012; Aragüez et al., 2013), é muito provável que eugenol e cinamaldeído detectados nos frutos após o armazenamento seja residual da aplicação dos óleos essenciais, pois estes compostos não foram identificados nos frutos do tratamento controle (Figuras 7 e 8).

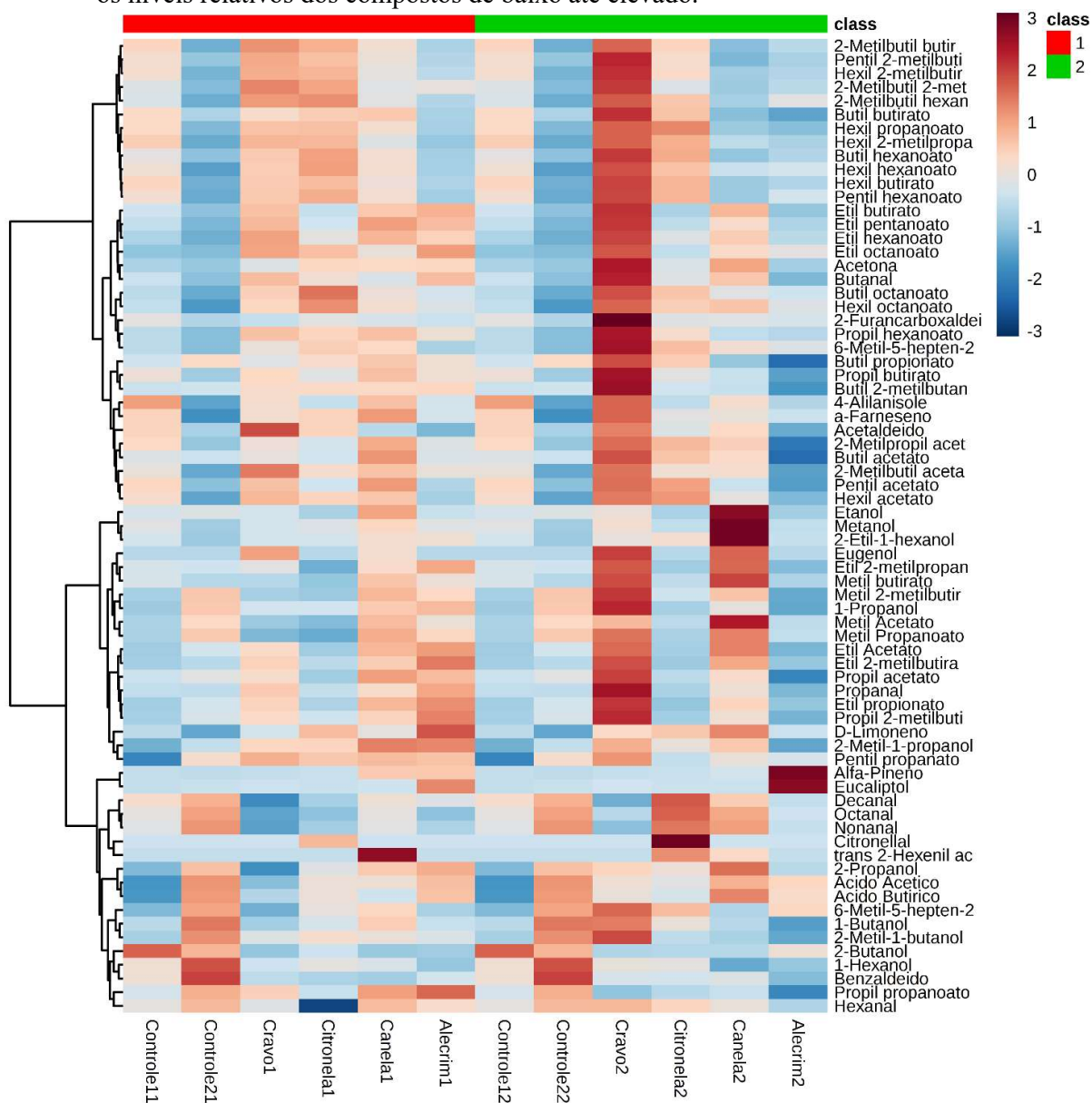
Identificou-se a emissão de D-limoneno em todos os tratamentos, tanto por imersão quanto por volatilização, em diferentes taxas. Entretanto, é possível observar que os frutos tratados com óleos essenciais apresentavam quantidades relativamente maiores que nos tratamentos controle (Figuras 7 e 9). No tratamento por imersão observou-se que a quantidade de D-limoneno liberada pelos frutos dependia da dose de óleo essencial utilizada (Figura 7), enquanto que no tratamento por volatilização os frutos tratados com o óleo essencial de citronela liberaram uma quantidade maior do composto (Figura 9). Rodríguez et al. (2014) identificaram que 97% dos terpenos liberados pela casca de laranjas maduras era D-limoneno, e que o aumento da produção deste terpeno pode facilitar a infecção dos frutos por microrganismo, o que facilitaria o acesso dos dispersores de sementes. Entretanto, Singh et al. (2010) observaram que 250  $\mu\text{L L}^{-1}$  de limoneno era capaz de inibir completamente o crescimento de *Aspergillus flavus*.

Outros terpenos, mono e sesquiterpenos, foram identificados nas amostras provenientes de frutos tratados com óleos essenciais, como  $\alpha$ -muuroleno, cariofileno, cânfora,  $p$ -cimeno,  $\beta$ -pineno,  $\beta$ -cadineno, entre outros (Figuras 8 e 10). A presença destes compostos e a quantidade liberada pelos frutos variou com o óleo essencial, dose e forma de tratamento (imersão ou volatilização). Estes compostos têm sido identificados em óleos essenciais de diferentes espécies vegetais e em produtos como própolis, apresentando eficiente ação antifúngica e antibacteriana em diversas espécies (CAKIR et al., 2004; MELLIU; STRATIS; CHINOU, 2007; SOKOVIĆ et al., 2009; KUNDU et al., 2013b).

Apesar de diversos trabalhos relatando a eficiência de terpenos e fenóis no controle de fungos e bactérias, é importante levar em consideração que estes compostos podem promover mudança no aroma dos frutos e modificar a aceitação dos frutos pelos consumidores. Chiebao (2013) identificou que bananas imaturas produziram uma elevada quantidade de  $\alpha$ -pineno, entretanto, algumas cultivares, mesmo após o amadurecimento, continuavam produzindo consideráveis quantidades deste terpeno e eram menos preferidas pelos consumidores devido seu aroma amadeirado, cheiro de terra e de pinho. Outros compostos, como eugenol e cariofileno, podem apresentar aroma doce, de especiaria, de cravo, apimentado e amadeirado em uma concentração de 50 ppm por até 44 horas (The Good Scents Company, 2016). Entretanto, Aragüez et al. (2013) observaram que cultivares de morango que produziam maiores quantidades de eugenol pelos aquênios e sépalas eram mais aromáticas e preferidas pelos consumidores.

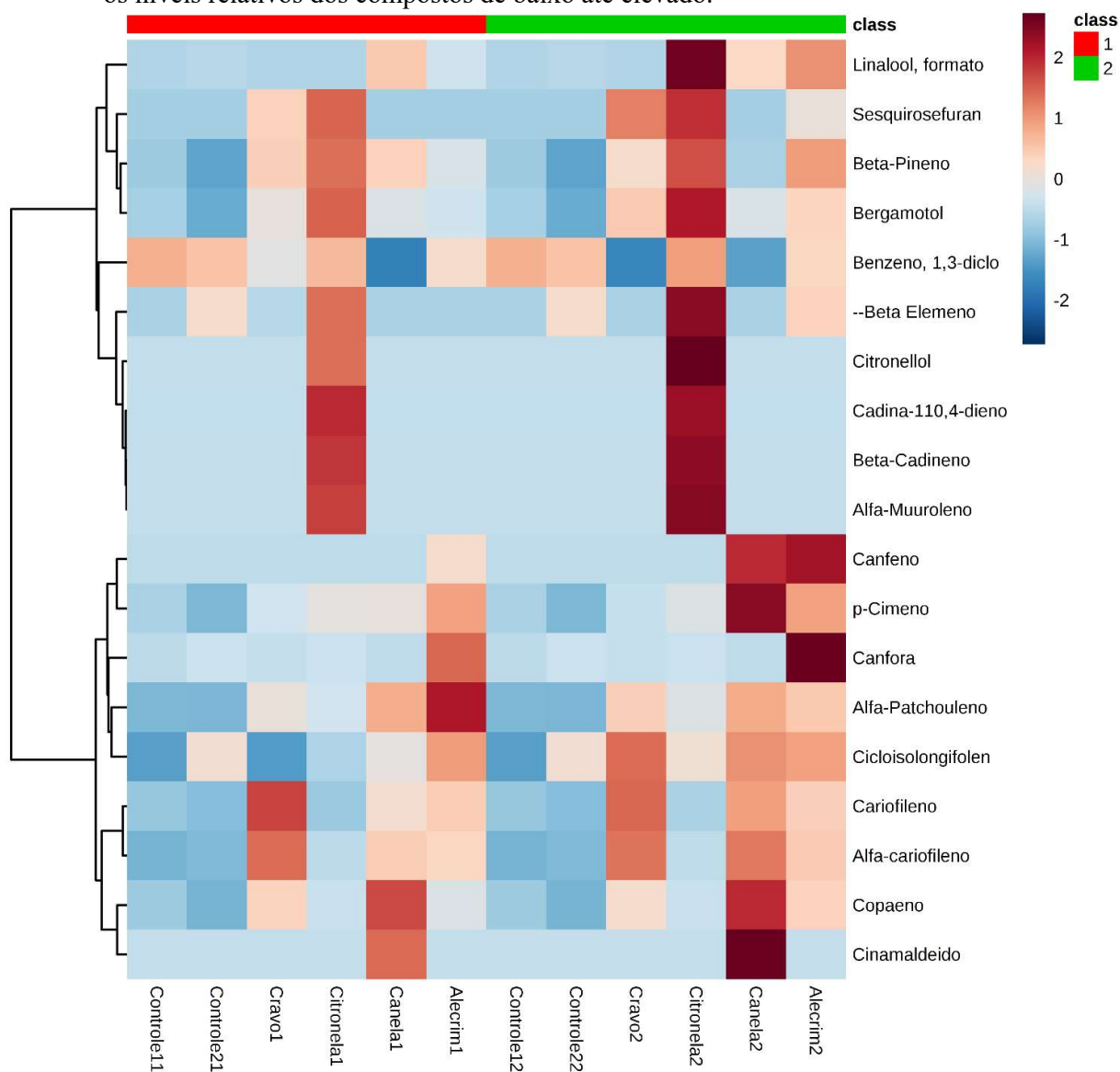
Portanto, apesar de identificar-se que o tratamento com óleos essenciais modificou o perfil de compostos aromáticos de maçãs 'Fuji', uma análise sensorial complementar a estes resultados e definiria se a aplicação destes compostos em pós-colheita afetaria a aceitação dos frutos pelos consumidores.

Figura 7 - *Heatmap* demonstrando a análise de *clusters* usando o algoritmo de *clustering* de Ward e distância Euclidiana calculados a partir de dados em  $\text{ng kg}^{-1} \text{L}^{-1}$ . Os compostos foram agrupados conforme as similaridades nas flutuações, as quais foram afetadas pelo tratamento pós-colheita por imersão dos frutos em óleo essencial. As classes 1 e 2 indicam as doses dos óleos essenciais de 2.000 e 4.000  $\mu\text{L L}^{-1}$ , respectivamente. Os óleos essenciais utilizados foram cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), citronela (*Cymbopogon winterianus*), canela (*Cinnamomum verum*), alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e dois tratamentos controle, controle 1 com frutos imersos em surfactante sem óleo essencial e controle 2 com frutos sem imersão. Os compostos foram coletados após quatro meses de armazenamento refrigerado ( $0\pm 0,5^\circ\text{C}/\text{UR } 90\pm 2\%$ ) mais sete dias em condições ambiente ( $23\pm 0,5^\circ\text{C}/\text{UR } 80\pm 2\%$ ). Os dados tiveram as médias centralizadas e divididas pela raiz quadrada do desvio padrão de cada composto antes da análise de *clusters* (*pareto scaling*). O gradiente de coloração indica os níveis relativos dos compostos de baixo até elevado.



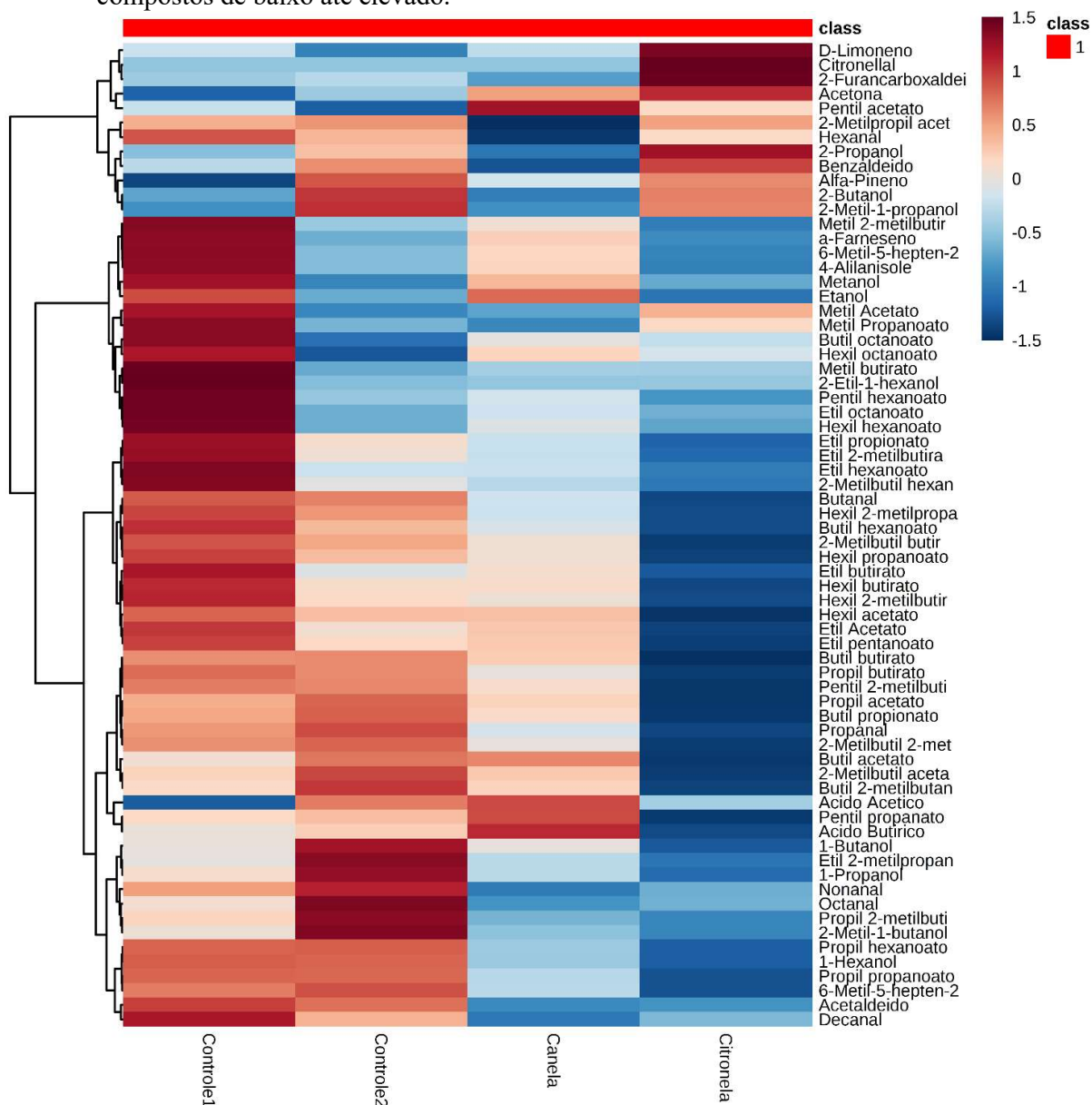
Fonte: produção do próprio autor, 2016.

Figura 8 - *Heatmap* demonstrando a análise de *clusters* usando o algoritmo de *clustering* de Ward e distância Euclidiana calculados a partir de dados em percentual. Os compostos foram agrupados conforme as similaridades nas flutuações, as quais foram afetadas pelo tratamento pós-colheita por imersão dos frutos em óleo essencial. As classes 1 e 2 indicam as doses dos óleos essenciais de 2.000 e 4.000  $\mu\text{L L}^{-1}$ , respectivamente. Os óleos essenciais utilizados foram cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), citronela (*Cymbopogon winterianus*), canela (*Cinnamomum verum*), alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e dois tratamentos controle, controle 1 com frutos imersos em surfactante sem óleo essencial e controle 2 com frutos sem imersão. Os compostos foram coletados após quatro meses de armazenamento refrigerado ( $0\pm 0,5^\circ\text{C}/\text{UR } 90\pm 2\%$ ) mais sete dias em condições ambiente ( $23\pm 0,5^\circ\text{C}/\text{UR } 80\pm 2\%$ ). Os dados tiveram as médias centralizadas e divididas pela raiz quadrada do desvio padrão de cada composto antes da análise de *clusters* (*pareto scaling*). O gradiente de coloração indica os níveis relativos dos compostos de baixo até elevado.



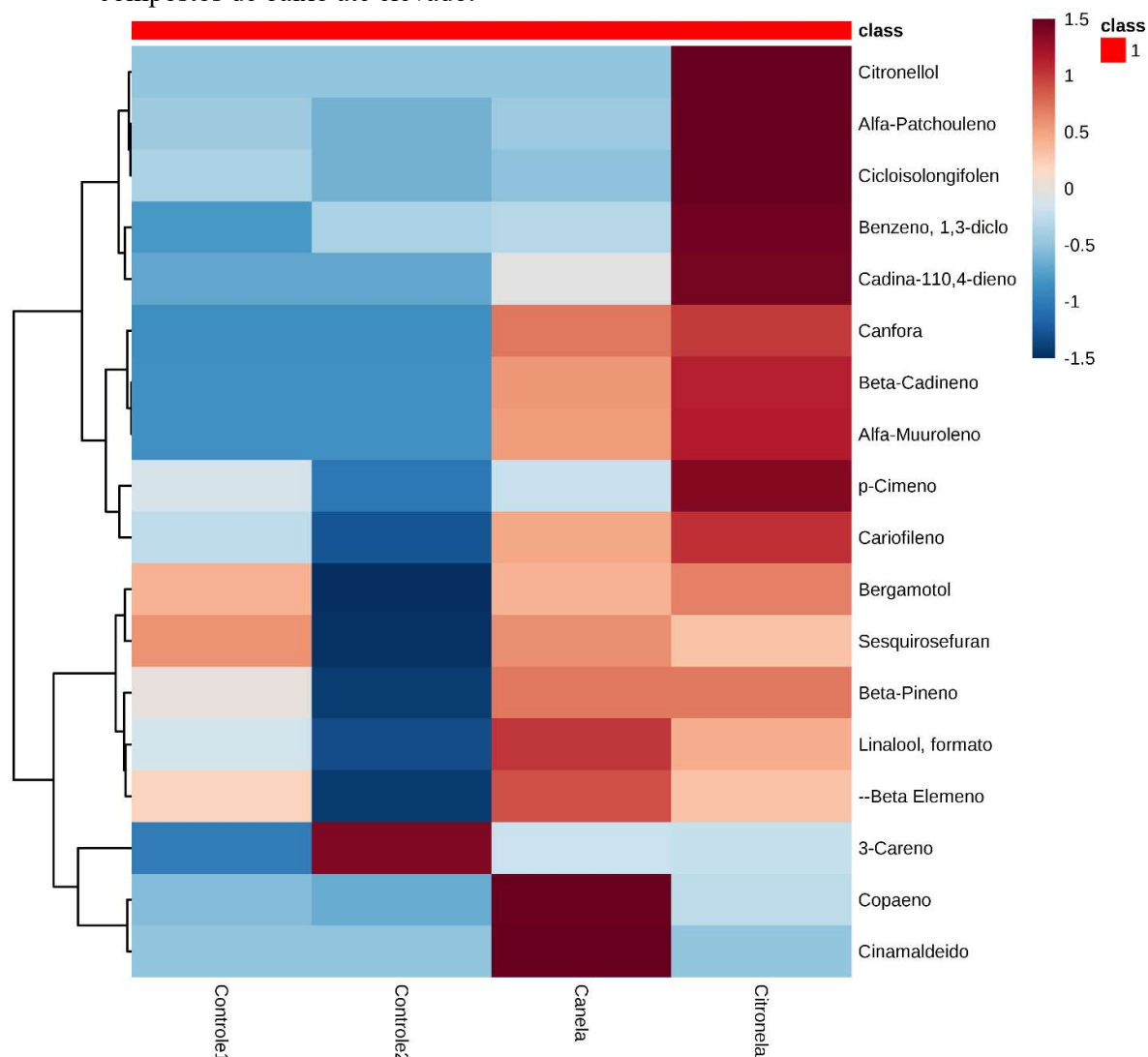
Fonte: produção do próprio autor, 2016.

Figura 9 - Heatmap demonstrando a análise de *clusters* usando o algoritmo de *clustering* de Ward e distância Euclidiana calculados a partir de dados em  $\text{ng kg}^{-1} \text{L}^{-1}$ . Os compostos foram agrupados conforme as similaridades nas flutuações, as quais foram afetadas pelo tratamento pós-colheita dos frutos com óleo essencial volatilizado em recipiente hermeticamente fechado na dose de  $100 \mu\text{L L}^{-1}$ . Os óleos essenciais utilizados foram canela (*Cinnamomum verum*), citronela (*Cymbopogon winterianus*) e dois tratamentos controle, controle 1 em que os frutos permaneceram no recipiente hermeticamente fechado sem óleo essencial e controle 2 em que os frutos permaneceram fora do recipiente de tratamento. Os compostos foram coletados após quatro meses de armazenamento refrigerado ( $0 \pm 0,5^\circ\text{C}/\text{UR } 90 \pm 2\%$ ) mais sete dias em condições ambiente ( $23 \pm 0,5^\circ\text{C}/\text{UR } 80 \pm 2\%$ ). Os dados tiveram as médias centralizadas e divididas pela raiz quadrada do desvio padrão de cada composto antes da análise de *clusters* (*pareto scaling*). O gradiente de coloração indica os níveis relativos dos compostos de baixo até elevado.



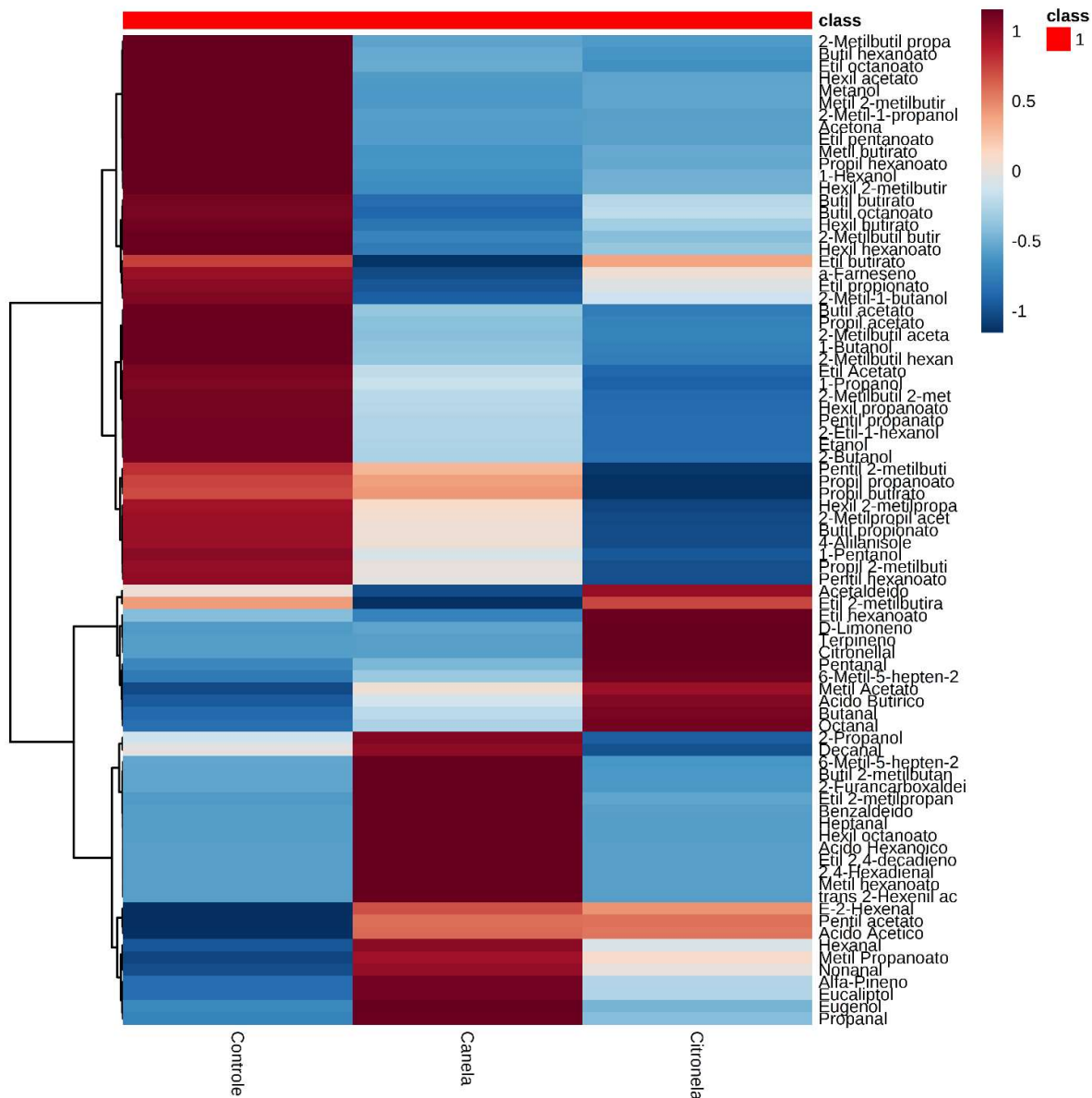
Fonte: produção do próprio autor, 2016.

Figura 10 - *Heatmap* demonstrando a análise de *clusters* usando o algoritmo de *clustering* de Ward e distância Euclidiana calculados a partir de dados em percentual. Os compostos foram agrupados conforme as similaridades nas flutuações, as quais foram afetadas pelo tratamento pós-colheita dos frutos com óleo essencial volatilizado em recipiente hermeticamente fechado na dose de  $100 \mu\text{L L}^{-1}$ . Os óleos essenciais utilizados foram canela (*Cinnamomum verum*), citronela (*Cymbopogon winterianus*) e dois tratamentos controle, controle 1 em que os frutos permaneceram no recipiente hermeticamente fechado sem óleo essencial e controle 2 em que os frutos permaneceram fora do recipiente de tratamento. Os compostos foram coletados após quatro meses de armazenamento refrigerado ( $0 \pm 0,5^\circ\text{C}/\text{UR } 90 \pm 2\%$ ) mais sete dias em condições ambiente ( $23 \pm 0,5^\circ\text{C}/\text{UR } 80 \pm 2\%$ ). Os dados tiveram as médias centralizadas e divididas pela raiz quadrada do desvio padrão de cada composto antes da análise de *clusters* (*pareto scaling*). O gradiente de coloração indica os níveis relativos dos compostos de baixo até elevado.



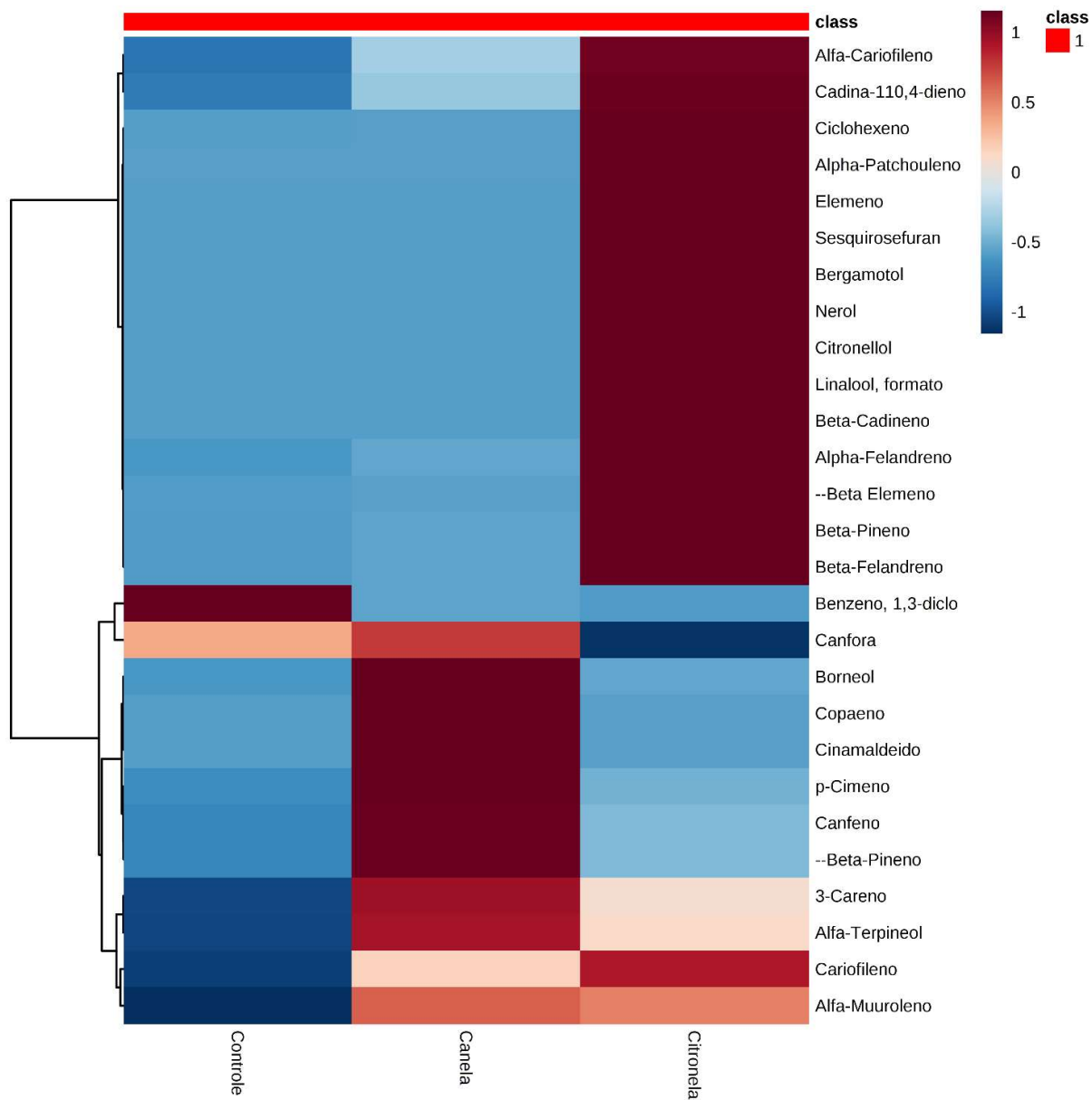
Fonte: produção do próprio autor, 2016.

Figura 11 - *Heatmap* demonstrando a análise de *clusters* usando o algoritmo de *clustering* de Ward e distância Euclidiana calculados a partir de dados em  $\text{ng kg}^{-1} \text{L}^{-1}$ . Os compostos foram agrupados conforme as similaridades nas flutuações, as quais foram afetadas pelo tratamento pós-colheita dos frutos com óleo essencial volatilizado em recipiente hermeticamente fechado na dose de  $100 \mu\text{L L}^{-1}$ . Os compostos foram coletados a partir dos recipientes de tratamento com os óleos essenciais de canela (*Cinnamomum verum*), citronela (*Cymbopogon winterianus*) e um tratamento controle em que os frutos permaneceram no recipiente hermeticamente fechado sem óleo essencial. Os dados tiveram as médias centralizadas e divididas pela raiz quadrada do desvio padrão de cada composto antes da análise de *clusters* (*pareto scaling*). O gradiente de coloração indica os níveis relativos dos compostos de baixo até elevado.



Fonte: produção do próprio autor, 2016.

Figura 12 - *Heatmap* demonstrando a análise de *clusters* usando o algoritmo de *clustering* de Ward e distância Euclidiana calculados a partir de dados em percentual. Os compostos foram agrupados conforme as similaridades nas flutuações, as quais foram afetadas pelo tratamento pós-colheita dos frutos com óleo essencial volatilizado em recipiente hermeticamente fechado na dose de  $100 \mu\text{L L}^{-1}$ . Os compostos foram coletados a partir dos recipientes de tratamento com os óleos essenciais de canela (*Cinnamomum verum*), citronela (*Cymbopogon winterianus*) e um tratamento controle em que os frutos permaneceram no recipiente hermeticamente fechado sem óleo essencial. Os dados tiveram as médias centralizadas e divididas pela raiz quadrada do desvio padrão de cada composto antes da análise de *clusters* (*pareto scaling*). O gradiente de coloração indica os níveis relativos dos compostos de baixo até elevado.



Fonte: produção do próprio autor, 2016.



## 4.5 CONCLUSÕES

- O tratamento pós-colheita com óleos essenciais, tanto por imersão quanto por volatilização, altera a produção de compostos voláteis de maçãs ‘Fuji’ após o armazenamento.
- Os frutos tratados com óleos essenciais, tanto por imersão como por volatilização, apresentam compostos voláteis das classes ésteres, aldeídos, álcoois, terpenos, terpenoides e fenilpropanoides.
- O tratamento dos frutos com óleo essencial na dose de 4.000  $\mu\text{L L}^{-1}$  promove uma maior taxa de emissão de terpenos, terpenoides e fenilpropanoides que a dose de 2.000  $\mu\text{L L}^{-1}$ .

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar de consideráveis avanços no armazenamento de maçãs ocorrido nas últimas décadas, como o advento de câmaras de atmosfera controlada e, mais recentemente, o desenvolvimento do inibidor da ação do etileno, 1-MCP, ainda muito se perde em pós-colheita por diversos fatores, sendo um dos principais a ocorrência de podridões pós-colheita. As principais podridões que vem sendo identificadas na fase de armazenamento dos frutos é mofo-azul (*Penicillium expansum*) e podridão olho-de-boi (*Criptosporiopsis perennans*). Portanto, observa-se a necessidade do desenvolvimento de uma tecnologia para a redução de perdas pós-colheita por podridão, contudo, que apresente baixo impacto ambiental.

Com os resultados obtidos neste trabalho, observou-se que a utilização em pré-colheita de produtos alternativos com características elicitoras de resistência, bem como, a aplicação de óleos essenciais em pós-colheita, apresentam potencial para o manejo de podridões em maçãs ‘Fuji’. Observou-se que o mananoligossacarídeo fosforilado da parede celular de *Sacharomyces cerevisiae* (Agromos<sup>®</sup>) reduziu diâmetro de lesão de mofo-azul na colheita e após o armazenamento refrigerado dos frutos e podridão olho-de-boi após o armazenamento refrigerado. Também se observou efeito positivo da aplicação pré-colheita de *Bacillus subtilis* (Serenade<sup>®</sup>), o qual reduziu diâmetro de lesão de mofo-azul e podridão olho-de-boi.

Todos os óleos essenciais testados neste trabalho reduziram a severidade de mofo-azul em maçãs ‘Fuji’ inoculadas com *P. expansum*, porém, o efeito depende da dose e período de tratamento dos frutos. Observou-se que o efeito dos óleos no controle de *P. expansum in vitro* é mais evidente do que *in vivo*, isso possivelmente, devido a uma interação dos óleos com o fruto, o que modifica seu efeito sobre o crescimento do fungo. Também se observou que o tratamento com os óleos essenciais modifica o perfil de compostos voláteis de maçãs ‘Fuji’ após o armazenamento, modificando a produção de aldeídos, ésteres e álcoois e deixando resíduos de terpenos e fenilpropanoides, bem como, altera a taxa de produção de etileno. Porém, essas modificações são mais evidentes quando se utiliza o tratamento dos frutos por imersão.

Portanto, outros experimentos são necessários para que se defina diversos fatores ligados a utilização de substâncias alternativas tanto em pré-colheita, quanto em pós-colheita. Experimentos envolvendo análise sensorial, análises relacionada a fisiologia do fruto, como alteração da atividade de enzimas relacionadas a patogênese, bem como experimentos para o aprimoramento da tecnologia, visando a definição do momento ideal de aplicação (pré e/ou pós-colheita), melhor forma de aplicação (imersão, volatilização, pulverização), óleo essencial ou molécula (s) mais eficiente (s) no manejo das podridões pós-colheita e repetição dos experimentos em diferentes locais de produção e cultivares.

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ACHUO, E.A. et al. The salicylic acid-dependant defense pathway is effective against different pathogens in tomato and tobacco. **Plant Pathology**, Malden, v. 53, n. 1, p. 65–72, 2004.

AGRIOS, G.N. **Plant pathology**. 5<sup>o</sup> ed. Amsterdam: Elsevier, 2004. 922 p.

ALARCON, A.A. et al. Emission of volatile sesquiterpenes and monoterpenes in grapevine genotypes following *Plasmopara viticola* inoculation in vitro. **Journal of Mass Spectrometry**, Hoboken, v. 50, n. 8, p. 1013-1022, 2015.

AMARANTE, C.V.T.; ERNANI, P.R.; STEFFENS, C.A. Predição de “bitter pit” em maçãs ‘Gala’ por meio da infiltração dos frutos com magnésio. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 31, n. 4, p. 962-968, 2009.

ANGIONI, A. et al. Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* essential oils from stem/leaves and flowers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 54, n. 12, p. 4364–4370, 2006.

ARAGÜEZ, I. et al. Eugenol production in achenes and receptacles of strawberry fruits is catalyzed by synthases exhibiting distinct kinetics. **Plant Physiology**, Malden, v. 163, n. 2, p. 946-958, 2013.

ARGENTA, L.C. et al. Diagnóstico da qualidade de maçãs no mercado varejista brasileiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 37, n. 1, p. 48-63, 2015.

ARGENTA, L.C. et al. Production of volatile compounds by Fuji apples following exposure to high CO<sub>2</sub> or low O<sub>2</sub>. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 52, n. 19, p. 5957-5963, 2004.

ARGENTA, L.C.; VIEIRA, M.J.; SCOLARO, A.M.T. Validação de catálogos de cores como indicadores do estágio de maturação e do ponto de colheita de maçã. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v. 23, n. 3, p. 71-77, 2010.

ARVANITOYANNIS, I.S.; MAVROMATIS, A. Banana cultivars, cultivation practices, and physicochemical properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, San Francisco, v. 49, n.2, p. 113-135, 2009.

BAKKALI, F. et al. Cytotoxicity and gene induction by some essential oils in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 585, n. 1-2, p. 1-13, 2005.

BAKKALI, F. et al. Antigenotoxic effects of three essential oils in diploid yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) after treatments with UVC radiation, 8-MOP plus UVA and MMS. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 606, n. 1-2, p. 27–38, 2006.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils - A review. **Food and Chemical Toxicology**, Amsterdam, v. 46, n. 2, p. 446–475, 2008.

BANGERTH, F.; SONG, J.; STREIF, J. Physiological impacts of fruit ripening and storage conditions on aroma volatile formation in apple and strawberry fruit: a review. **HortScience**, Pleasanton, v.47, n. 1, p.4-10, 2012.

- BARALDI, E. et al. Studies on thiabendazole resistance of *Penicillium expansum* of pears: pathogenic fitness and genetic characterization. **Plant Pathology**, Malden, v. 52, n. 3, p. 362–370, 2003.
- BARBOSA, M.A.G.; LARANJEIRA, D.; COELHO, R.S.B. Physiological cost of induced resistance in cotton plants at different nitrogen levels. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 34, n. 4, p. 338-342, 2008.
- BÉCOT, S. et al. Phytogard (K<sub>2</sub>HPO<sub>3</sub>) induces localized resistance in cauliflower to downy mildew of crucifers. **Crop Protection**, Surrey, v. 19, n. 6, p. 417-425, 2000.
- BLUM, L.E.B. et al. *Cryptococcus laurentii* aplicado em pós-colheita reduz podridões em maçãs. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 4, p. 433-436, 2004.
- BLUM, L.E.B. et al. Fosfitos aplicados em pós-colheita reduzem o mofo-azul em maçãs ‘Fuji’ e ‘Gala’. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 29, n. 2, p. 265-268, 2007.
- BOAVA, L.P. et al. Efeito de indutores bióticos e abióticos na atividade de quitinase e peroxidase e no controle da ferrugem causada por *Puccinia psidii* em eucalipto. **Summa Phytopathology**, Botucatu, v. 36, n. 2, p. 168-172, 2010.
- BOER, A.S.; DIDERICHSEN, B. On the safety of *Bacillus subtilis* and *B. amyloliquefaciens*: A review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Gewerbestrasse, v. 36, n. 1, p. 1-4, 1991.
- BOKSHI, A.I.; MORRIS, S.C.; DEVERALL, B.J. Effects of benzothiadiazole and acetylsalicylic acid on  $\beta$ -1,3-glucanase activity and disease resistance in potato. **Plant Pathology**, Malden, v. 52, n. 1, p. 22–27, 2003.
- BOMFIM, N.S. et al. Antifungal activity and inhibition of fumonisin production by *Rosmarinus officinalis* L. essential oil in *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg. **Food Chemistry**, Washington, v. 166, n. 1, p. 330-336, 2015.
- BONALDO, S.M. et al. Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de pepino contra *Colletotrichum lagenarium* pelo extrato aquoso de *Eucalyptus citriodora*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 2, p. 128-134, 2004.
- BOTH, V. et al. Effect of storage under extremely low oxygen on the volatile composition of ‘Royal Gala’ apples. **Food Chemistry**, Washington, v.156, n. 1, p.50-57, 2014.
- BRAGA JUNIOR, S.S.; VEIGA NETO, A.R; MORAES, N.R. Atributos de estilo de vida do consumidor relacionados ao consumo de produtos orgânicos no varejo especializado. **Revista Brasileira de Marketing**, São Paulo, v. 13, n. 5, p. 36-46, 2014.
- CAKIR, A. et al. Composition and antifungal activity of essential oils isolated from *Hypericum hyssopifolium* and *Hypericum heterophyllum*. **Flavour and Fragrance Journal**, Firmenich, v. 19, n. 1, p. 62-68, 2004.
- CAMILETTI, B.X. et al. Natural control of corn postharvest fungi *Aspergillus flavus* and *Penicillium* sp. using essential oils from plants grown in Argentina. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 79, n. 12, p. M2499-M2506, 2014.

CANTÍN, C.M.; FIDELIBUS, M.W.; CRISOSTO, C.H. Application of abscisic acid (ABA) at verais on advanced red color development and maintained postharvest quality of ‘Crimson Seedless’ grapes. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 46, n. 3, p. 237–241, 2007.

CAO, J. et al. Effects of postharvest salicylic acid dipping on *Alternaria* rot and disease resistance of jujube fruit during storage. **Journal of the Science and Food Agriculture**, Oxford v. 93, n. 13, p. 3252-3258, 2013.

CAO, J.K.; JIANG, W.B. Induction of resistance in Yali pear (*Pyrus bretschneideri* Rehd.) fruit against postharvest diseases by acibenzolar-S-methyl sprays on trees during fruit growth. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 110, n. 2, p. 181-186, 2006.

CARDOSO FILHO, J. A. **Efeito de extratos de albedo de laranja (*Citrus sinensis*) dos indutores de resistência ácido salicílico, acilbenzolar-S-Metil e *Saccharomyces cerevisiae* no controle de *Phyllosticta citricarpa* (Teleomorfo: *Guignardia citricarpa*)**. 2003. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo-USP, Piracicaba, 2003.

CAVALCANTI, L.S.; BRUNELLI, K.R.; STANGARLIN, J.R. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência induzida. In: CAVALCANTI, L.S. et al. **Indução de Resistência em Plantas a Patógenos e Insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005. p. 81-124.

CHAIBUB, B.A. et al. Composição química do óleo essencial e avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial, extrato etanólico bruto e frações das folhas de *Spiranthera odoratissima* A. St.-Hil. **Revista Brasileira de Planta Medicinal**, Campinas, v. 15, n. 2, p. 225-229, 2013.

CHEN, Q. et al. Effect of citronella essential oil on the inhibition of postharvest *Alternaria alternata* in cherry tomato. **Journal of the Science and Food Agriculture**, Oxford, v. 94, n. 12, p. 2441-2447, 2014.

CHENG, S.S. et al. Chemical composition and mosquito larvicidal activity of essential oils from leaves of different *Cinnamomum osmophloeum* provenances. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington v. 52, n. 14, p. 4395-4400, 2004.

CHIEBAO, H. P. **Perfil de compostos voláteis de banana submetidos a diferentes tratamentos pós-colheita e suas correlações com a expressão diferencial dos receptores de etileno**. 2013. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

CONRATH, U.; PIETERSE, C.M.J.; MAUCH-MANI, B. Priming in plant pathogen interactions. **Trends in Plant Science**, London, v.7, n. 5, p.210-216. 2002.

COOLS, H.J.; ISHII, H. Pre-treatment of cucumber plant with acibenzolar-S-methyl systemically primes phenylalanine ammonia lyase gene (PAL1) for enhanced expression upon attack with a pathogenic fungus. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, Malden, v. 61, n. 5, p. 273-280, 2002.

CORRÊA, T.R. et al. Qualidade de maçãs ‘Fuji’ armazenadas em atmosfera controlada e influência do clima na degenerescência de polpa. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, n. 6, p. 531-538, 2010.

COSTA, J.B.C. et al. Indução de resistência em mudas de cacaueteiro contra *Moniliophthora perniciosa* por produto à base de mananoligossacarídeo fosforilado. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 35, n. 5, p. 285-294, 2010.

COUTO, E.B. **Avaliação de metil jasmonato na indução de resistência de plantas de *Eucalyptus* spp. ao psilídeo-de-concha *Glycaspis brimblecombei* Moore (hemiptera: psyllidae).** 2006. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2006.

DANNER, M.A. et al. Indução de resistência à podridão-parda em pêssegos pelo uso de eliciadores em pós-colheita. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.43, n.7, p.793-799, 2008.

DANTAS, S.A.F. et al. Indutores de resistência na proteção do mamão contra podridões pós-colheita. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 30, n. 3, p. 314-319, 2004.

DI PIERO, R.; GARCIA, D.; TONUCCI, N. Indutores Bióticos. In: CAVALCANTI, L.S. et al. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos.** Piracicaba: FEALQ. 2005.

DI PIERO, R.M.; GUARDA, M.V. Quitosana reduz a severidade da antracnose e aumenta a atividade da glucanase em feijoeiro comum. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 9, p 1121-1128, 2008.

DROBY, S. et al. Role of citrus volatiles in host recognition, germination and growth of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 49, n. 3, p. 386–396, 2008.

DURRANT, W.E.; DONG, X. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 42, n. 1, p. 185–209, 2004.

ECHEVERRÍA G.T. et al. Aroma volatile compounds of ‘Fuji’ apples in relation of harvest date and cold storage technology – A comparison of two seasons. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 32, n. 1, p. 29-44, 2004.

ELIZQUIVEL, P. et al. The effect of essential oils on norovirus surrogates. **Food Control**, Amsterdam, v. 32, n. 1, p. 275-278, 2013.

FADLI, M. et al. Antibacterial activity of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* essential oils against nosocomial infection-bacteria and their synergistic potential with antibiotics. **Phytomedicine**, Amsterdam, v. 19, n. 5, p. 464-471, 2012.

FAN, X.; MATTHEIS, J.P.; BUCHANAN, D. Continuous requirement of ethylene for apple fruit volatile synthesis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 46, n.5, p. 1959-1963, 1998.

FELLMAN, J.K. et al. Factors that influence biosynthesis of volatile flavor compounds in apple fruits. **HortScience**, Pleasanton, v. 35, n. 6, p. 1026-1033, 2000.

FERNANDEZ, M.R. **Manual para laboratório de fitopatologia.** Passo Fundo: Embrapa-CNPT, 1993. 128p.

FIEDLER, S.; HEERKLOTZ, H. Vesicle leakage reflects the target selectivity of antimicrobial lipopeptides from *Bacillus subtilis*. **Biophysical Journal**, Maryland Heights, v. 109, n. 10, p. 2079–2089, 2015.

FILIPPIS, F.M. **Extração com CO2 supercrítico de óleos essenciais de Honsho e Ho-sho-experimentos e modelagem.** 2001. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.

FIORI, A.C.G. et al. Atividade de lecitinas sobre a germinação de esporos e indução de fitoalexinas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 25, n. 266, p.373, 2000.

FISHER, K.; PHILLIPS, C. Potential antimicrobial uses of essential oils in food: Is citrus the answer? **Trends in Food Science and Technology**, Amsterdam, v. 19, n. 3, p. 156–164, 2008.

FREEPONS, D. Chitosan, does it have a place in agriculture? **Proceedings of the Plant Growth Regulation Society of America**, Alexandria, v.1, n.1, p. 11–19, 1991.

FURTADO, L.M. et al. Utilização de Ecolife® e Acibenzolar –s-metil (ASM) no Controle da Antracnose da banana em pós-colheita. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.36, n.3, p.237-239, 2010.

GALDEANO, D.M. et al. Proteção do cafeeiro contra cercosporiose por acibenzolar-S-metil e proteína harpina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.45, n.7, p.686-692, 2010.

GE, L. et al. Effect of chitin on the antagonistic activity of *Rhodotorula glutinis* against *Botrytis cinerea* in strawberries and the possible mechanisms involved. **Food Chemistry**, Washington, v. 120, n. 2, p. 490-495, 2010.

GE, Y.H. et al. Induced resistance against Fusarium and Pink rots by acibenzolar-S-Methyl in harvested muskmelon (cv. Yindi). **Agricultura Science in China**, Pequim, v. 7, n. 1, p. 58–64, 2008.

GOUVEA, A. et al. Controle de doenças foliares e de flores e qualidade pós-colheita do morangueiro tratado com *Saccharomyces cerevisiae*. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 4, p. 527-533, 2009.

GSC. **The Good Scents Company**. Disponível em: <http://www.thegoodscentscopy.com/index.html>. Acesso em: 19 de julho de 2016.

GUZZO, S.D. Proteínas relacionadas à patogênese. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 11, n. 1, p. 283-332, 2003.

HE, J.; YU, S.; MA, C. Effects of Plant Growth Regulator on Endogenous Hormone Levels during the Period of the Red Globe Growth. **Journal of Agricultural Science**, Toronto, v. 1, n. 1, p. 92-100, 2009.

HEERKLOTZ, H.; SEELIG, J. Leakage and lysis of lipid membranes induced by the lipopeptide surfactin, **European Biophysics Journal**, Gewerbestrasse, v. 36, n. 4-5, p. 305–314, 2007.

HEIL, M. The ecological concept of costs of induced systemic resistance (ISR). **European Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v. 107, n. 1, p. 137-146, 2001.

HOET, S. et al. Antitrypanosomal compounds from leaf essential oil of *Strychnos spinosa*. **Planta Medica**, Nova Iorque, v. 72, n. 5, p. 480–482, 2006.

HOLMES, G.J.; ECKERT, J.W. Sensitivity of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* to postharvest citrus fungicides in California. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 89, n. 9, p. 716–721, 1999.

IRITI, M.; MAPELLI, S.; FAORO, F. Chemical-induced resistance against post-harvest infection enhances tomato nutritional traits. **Food Chemistry**, Washington v. 105, n. 3, p. 1040–1046, 2007.

- JHALEGAR, M.D.J.; SHARMA, R.R.; SINGH, D. In vitro and in vivo activity of essential oils against major postharvest pathogens of Kinnow (*Citrus nobilis* × *C. deliciosa*) mandarin. **Journal of Food Science and Technology**, Rockville, v. 52, n. 4, p. 2229-2237, 2015.
- JIMENEZ-DEL RIO, M., VELEZ-PARDO, C. Transition metal-induced apoptosis in lymphocytes via hydroxyl radical generation, mitochondria dysfunction, and caspase-3 activation: an *in vitro* model for neurodegeneration. **Archives of Medical Research**, Cidade do México, v. 35, n. 1, 185-193, 2004.
- JING, L. et al. Antifungal activity of citrus essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 62, n. 14, p. 3011-3033, 2014.
- KHAN, A. et al. *Ocimum sanctum* essential oil and its active principles exert their antifungal activity by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v. 161, n. 10, p. 816–823, 2010.
- KHONG, N.G. et al. Induction of resistance in wheat against powdery mildew by bacterial cyclic lipopeptides. **Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences**, San Francisco, v. 77, n. 3 p. 39-51, 2012.
- KNEE, M.; HATFIELD, S.G.S. The metabolism of alcohols by apple fruit tissue. **Journal of the Science and Food Agriculture**, Oxford, v. 32, n. 6, p. 593-600, 1981.
- KONG, M. et al. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the review. **International Journal of Food Microbiology**, Toulouse, v. 144, n. 1, p. 51-63, 2010.
- KOVALESKI, A. et al. **Produção integrada de maçãs no Brasil**. Embrapa Uva e Vinho, 2003. Disponível em: <  
<https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Maca/ProducaoIntegradaMaca/>>. Acesso em: 01 de abril 2016.
- KRETZSCHMAR, A. A. et al. Efeito de fitorreguladores sobre a incidência de podridão carpelar em maçãs ‘Fuji’. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 29, n. 3, p.414-416, 2007.
- KUNDU, A. et al. Antioxidant and antifungal properties of the essential oil of *Anisomeles indica* from India. **Journal of Medicinal Plants Research**, Ilha Victoria, v. 7, n. 24, p.1774-1779, 2013a.
- KUNDU, A. et al. Cadinene sesquiterpenes from *Eupatorium adenophorum* and their antifungal activity. **Journal of Environmental Science and Health**, San Francisco, v. 48, n. 6, p. 516-522, 2013b.
- KYUNG, M.; HAMILTON-KEMP, T.R.; ARCHBOLD, D.D. Biosynthesis of trans-2-hexenal in response to wounding in strawberry fruit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 54, n. 4, p. 1442-1448, 2006.
- LIMA, G. et al. Integrated control of blue mold using new fungicides and biocontrol yeasts lowers levels of fungicide residues and patulin contamination in apples. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 60, n. 2, p. 164-172, 2011.
- LIU, H. et al. Postharvest BTH treatment induces resistance of peach (*Prunus persica* L. cv. Jiubao) fruit to infection by *Penicillium expansum* and enhances activity of fruit defense mechanisms. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 35, n. 3, p. 263-269, 2005.

- LIU, J. et al. Effects of chitosan on control of postharvest diseases and physiological responses of tomato fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 44, n. 3, p. 300-306, 2007.
- LOPES, E.A.G.L. **Controle biológico de Botrytis cinerea in vitro e em mudas de Eucalyptus sp.** 2001. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras. Lavras - MG, 2001.
- LORENZETTI, E.R. et al. Bioatividade de óleos essenciais no controle de *Botrytis cinerea* isolado de morangueiro. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.13, n. especial, p.619-627, 2011.
- LOU, M.M. et al. Antibacterial activity and mechanism of action of chitosan solutions against apricot fruit rot pathogen *Burkholderia seminalis*. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 346, n. 11, p. 1294-1301, 2011.
- LU, H. et al. Effect of chitin on the antagonistic activity of *Rhodosporidium paludigenum* against *Penicillium expansum* in apple fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 92, n. 1, p. 9-15, 2014.
- MAGET-DANA, R. et al. Surfactin/iturin A interactions may explain the synergistic effect of surfactin on the biological properties of iturin A. **Biochimie**, Paris, v. 74, p. 1047-1051, 1992.
- MARI, M. et al. Antifungal vapour-phase activity of allyl-isothiocyanate against *Penicillium expansum* on pears. **Plant Pathology**, Malden, v. 51, n. 2, p. 231–236, 2002.
- MARIN, A.B. et al. Measuring consumer response to ‘Gala’ apples treated with 1-methylcyclopropene (1-MCP). **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 51, n. 1, p. 73–79, 2009.
- MASOTTI, V. et al. Seasonal and phenological variations of the essential oil from the narrow endemic species *Artemisia molinieri* and its biological activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 51, n. 24, p. 7115-7121, 2003.
- MATTHEIS, J.P. et al. Changes in head space volatiles during physiological development of Bisbee Delicious apple fruit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 39, n. 11, p. 1902-1906, 1991.
- MATTHEIS, J.P.; BUCHANAN, D.; FELLMAN, J.K. Volatile compound production by Bisbee Delicious Apples after sequential atmosphere storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 43, n. 1, p. 194-199, 1995.
- MATTHEIS, L.P.; FELLMAN, J.K. Preharvest factors influencing flavor of fresh fruit and vegetables. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam v. 15, n. 3, p. 227-232, 1999.
- MAZARO, S.M. et al. Comportamento pós-colheita de frutos de morangueiro após a aplicação pré-colheita de quitosana e acibenzolar-S-metil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 1, p. 185-190, 2008.
- MEDEIROS, H.A. Diagnóstico e caracterização de perdas por podridões pós-colheita em maçãs. In: ENCONTRO NACIONAL SOBRE FRUTICULTURA DE CLIMA TEMPERADO, 14., 2015, Fraiburgo. **Anais...** Caçador: EPAGRI, v.1, 2015, p.48-52.



MEHINAGIC, E. et al. Characterisation of odor-active volatiles in apples: Influence of cultivars and maturity stage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 54, n. 7, p. 2678–2687, 2006.

MELLIU, E.; STRATIS, E.; CHINOU, I. Volatile constituents of propolis from various regions of Greece – Antimicrobial activity. **Food Chemistry**, Washington, v. 103, n. 2, p. 375-380, 2007.

MENG, X. et al. Physiological responses and quality attributes of table grape fruit to chitosan preharvest spray and postharvest coating during storage. **Food Chemistry**, Washington, v. 106, n. 2, p. 501-508, 2008.

MÉTRAUX, J.P.; NAWRATH, C.; GENOUD, T. Systemic acquired resistance. **Euphytica**, Nova Yorque, v. 124, n. 2, p. 237-243, 2002.

MILLER, B.D. et al. Use of global trade item numbers in the investigation of a salmonella newport outbreak associated with blueberries in Minnesota, 2010. **Journal Food Protect**, Des Moines, v. 76, n. 5, p. 762–769, 2013.

MOGHADDAM, M. et al. Chemical composition and antifungal activity of essential oil from the seed of *Echinophora platyloba* DC. against phytopathogens fungi by two different screening methods. **Food Science and Technology**, Amsterdam, v. 61, n. 2, p. 536-542, 2015.

MOREIRA, R.R.; NESI, C.N.; DE MIO, L.L.M. *Bacillus* spp. and *Pseudomonas putida* as inhibitors of the *Colletotrichum acutatum* group and potential to control *Glomerella* leaf spot. **Biological Control**, Amsterdam, v. 72, n. 1, p. 30–37, 2014.

MORI, K. et al. Effects of abscisic acid treatment and night temperatures on anthocyanin composition in Pinot noir grapes. **Vitis - Journal of Grapevine Research**, Siebeldingen, v. 44, n. 4, p. 161–165, 2005.

NASCIMENTO, L.C.; NERY, A.R.; RODRIGUES, L.N. Controle de *Colletotrichum gloeosporioides* em mamoeiro, utilizando extratos vegetais, indutores de resistência e fungicida. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 30, n. 3, p. 313-319, 2008.

NCUS, **North Carolina State University**, Material Fact Sheet – *Bacillus subtilis*, 2010. Disponível em:  
<<http://www.cefs.ncsu.edu/newsevents/events/2010/sosa2010/sosa2010calendar.html#falltomato>>. Acesso em: 17 de fevereiro de 2016.

NERI, F.; MARI, M.; BRIGATI, S. Control of *Penicillium expansum* by plant volatile compounds. **Plant Pathology**, Malden, v. 55, n. 1, p. 100-105, 2006.

OLIVEIRA, C.E. et al. Effects of post-harvest treatment using chitosan from *Mucor circinelloides* on fungal pathogenicity and quality of table grapes during storage. **Food Microbiology**, Amsterdam, n. 44, n. 1, p. 211–219, 2014.

ONGENA, M.; JACQUES, P. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. **Trends in Microbiology**, Maryland Heights, v. 16, n. 3, p. 115-125, 2008.

ORABY, M.M.; EL-BOROLLOS, A.M. Essential oils from some Egyptian aromatic plants as an antimicrobial agent and for prevention of potato virus Y transmission by aphids. **Annals of Agricultural Science**, Cairo, v. 58, n. 1, p. 97-103, 2013.

- ORTIZ-SERRANO, P.; GIL, J.V. Quantitative comparison of free and bound volatiles of two commercial tomato cultivars (*Solanum lycopersicum* L.) during ripening. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington v. 58, n. 2, p. 1106-1114, 2010.
- PATEL, H. et al. All-or-none membrane permeabilization by fengycin-type lipopeptides from *Bacillus subtilis* QST713. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1808, n. 8, p. 2000-2008, 2011.
- PATRIGNANI, F. et al. Effects of sub-lethal concentrations of hexanal and 2-(E)-hexenal on membrane fatty acid composition and volatile compounds of *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli*. **International Journal of Food Microbiology**, Toulouse, v. 123, n. 1-2, p. 1-8, 2008.
- PAVIANI, T.C. **Extração com CO<sub>2</sub> a altas pressões e fracionamento do óleo essencial de capim-limão utilizando peneiras moleculares**. 2004. Dissertação (Mestrado) – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim-RS, 2004.
- PEPPI, M.C.; FIDELIBUS, M.W.; DOKOOZLIAN, N. Abscisic acid application timing and concentration affect firmness, pigmentation, and color of ‘Flame Seedless’ grapes. **HortScience**, Pleasanton, v. 41, n. 6, p. 1440-1445, 2006.
- PEREIRA, R.B. et al. Citronella essential oil in the control and activation of coffee plants defense response against rust and brown eyespot. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 36, n. 4, p. 383-390, 2012.
- PÉREZ-ALFONSO, C.O. et al. The effects of essential oils carvacrol and thymol on growth of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* involved in lemon decay. **International Journal of Food Microbiology**, Toulouse, v. 158, n. 2, p. 101-106, 2012.
- PIOTROSKI, D.R. et al. Análogos da capsaicina: avaliação da atividade antimicrobiana. In: XVI SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA DA UTFPR, 2011, Curitiba. **Anais XVI Seminário de Iniciação Científica e Tecnológica da UTFPR**, Curitiba: UTFPR, 2011.
- PLOTTO, A.; McDANIEL, M.R.; MATTHEIS, J.P. Characterization of ‘Gala’ apple aroma and flavor: Differences between controlled atmosphere and air storage. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 124, n. 4, p. 416-423, 1999.
- PLOTTO, A.; McDANIEL, M.R.; MATTHEIS, J.P. Characterization of changes in ‘Gala’ apple aroma during storage using osme analysis, a gas chromatography–olfactometry technique. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 125, n. 6, p. 714-722, 2000.
- PLOTTO, A.; ROBERTS, D.D.; ROBERTS, D.G. Evaluation of plant essential oils as natural postharvest disease control of tomato (*Lycopersicon esculentum*). **Acta Horticulturae**, Wellington, v. 628, n. 1, p. 737-745, 2003.
- POPA, I. et al. Efficacy of chlorine dioxide gas sachets for enhancing the microbiological quality and safety of blueberries. **Journal Food Protect**, Des Moines, v. 70, n. 9, p.2084-2088, 2007.
- RABBANY, A.B.M.G.; MIZUTANI, F. Effect of essential oils on ethylene production and ACC content in apple fruit and peach seed tissues. **Journal of Japanese Society for Horticultural Science**, Kyoto, v. 65, n. 1, p. 7-13, 1996.

- RAVI, K.M.N.V. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and Functional Polymers**, Amsterdam, v. 46, n. 1, p. 1-27, 2000.
- RIBEIRO, F.W.M. et al. Chemical modification of gum arabic and its application in the encapsulation of *Cymbopogon citratus* essential oil. **Journal of Applied Polymer Science**, Malden, v. 132, n. 8, p. 41519-41525, 2015.
- RÍOS, M.Y. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from *Annona cherimola* (Annonaceae). **Revista de la Sociedad Química de México**, Guanajuato, v. 47, n. 2, p.139-142, 2003.
- ROBERTO, S.R. et al. Application timing and concentration of abscisic acid improve color of 'Benitaka' table grape. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam v. 142, n. 1, p. 44–48, 2012.
- RODRIGUES, A.A.C.; BEZERRA NETO, E.; COELHO, R.S.B. Indução de resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* em caupi: eficiência de indutores abióticos e atividade enzimática elicitada. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 5, p. 492-499, 2006.
- RODRIGUES, E. et al. Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de alface em sistema de cultivo orgânico contra *Sclerotinia sclerotiorum* pelo extrato de gengibre. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, n. 2, p. 124-128, 2007.
- RODRÍGUEZ, A. et al. Terpene Down-Regulation Triggers Defense Responses in Transgenic Orange Leading to Resistance against Fungal Pathogens. **Plant Physiology**, Malden, v. 164, n. 1, p. 321-339, 2014.
- ROMANAZZI, G. et al. Effects of pre- and postharvest chitosan treatments to control storage grey mould of table grapes. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 67, n. 5, p. 1862–1867, 2002.
- ROSENBERGER, D.A. Postharvest diseases. In: JONES, A.L.; ALDWINCKLE, H.S. (eds) **Compendium of Apple and Pear Diseases**. Saint Paul: APS Press, 1990, p. 53-54.
- ROVERATTI, D.S. **Proteção de plantas de café (*Coffea arabica* L.) contra *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. por *Saccharomyces cerevisiae***. 1989. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1989. 94 p.
- ROZWALKA, L.C. et al. Extratos, decoctos e óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas na inibição de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides* de frutos de goiaba. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 2, p. 301-307, 2008.
- SCHAFFER, R.J. et al. A genomic approach reveals that aroma production in apple is controlled by ethylene predominantly at the final step in each biosynthetic pathway. **Plant Physiology**, Malden, v.144, n. 4, p.1899-1912, 2007.
- SERRANO, L. et al. The use of *Bacillus subtilis* QST 713 and *Bacillus pumilus* QST 2808 as protectant fungicides in conventional application programs for black leaf streak control. **Acta Horticulturae**, Wellington, n. 986, v. 1, p. 149-155, 2013.
- SETHI, S. et al. Antioxidant assay and antifungal activity of essential oil and various extracts from *Alpinia allughas* Roscoe: A potent Zingiberaceous Herb. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, San Francisco, v. 19, n. 2, p. 358-367, 2016.

SHAO, X. et al. Effect of postharvest application of chitosan combined with clove oil against citrus green mold. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam v. 99, n. 1, p. 37-43, 2015.

SHARMA, N.; TRIPATHI, A. Effects of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem. **Microbiological Research**, Amsterdam, v. 163, n. 3, p. 337-344, 2008.

SHARMA, N.; TRIPATHI, A. Fungitoxicity of the essential oil of *Citrus sinensis* on post-harvest pathogens. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Nova Yorque, v. 22, n. 6, p. 587-593, 2006.

SHARMA, R.R.; SINGH, D.; SINGH, R. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. **Biological Control**, Amsterdam, v. 50, n. 3, p. 205-221, 2009.

SIEGRIST, L. et al. Chemical induced resistance in green bean against bacterial and fungal pathogens. **Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz**, Nova Yorque, v. 104, n. 6, p. 559-610, 1997.

SILVA, J. et al. Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of Eucalyptus. **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdam, v. 89, n. 2-3, p. 277-283, 2003.

SILVA, R.F.; PASCHOLATI, S.F.; BEDENDO, I.P. Indução de resistência em tomateiro por extratos aquosos de *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra *Ralstonia solanacearum*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n.3, p. 189-196, 2007.

SILVEIRA, J.C. et al. Levantamento e análise de métodos de extração de óleos essenciais. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v.8, n.15; p. 2038-2052, 2012.

SINGH, P. et al. Chemical profile, antifungal, antiaflatoxigenic and antioxidant activity of *Citrus maxima* Burm. and *Citrus sinensis*. L. Osbeck essential oils and their cyclic monoterpene, dl-limonene. **Food and Chemical Toxicology**, Amsterdam, v. 48, n. 6, p. 1734-1740, 2010.

SINGH, S.P. et al. Preharvest application of abscisic acid promotes anthocyanins accumulation in pericarp of litchi fruit without adversely affecting postharvest quality. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 96, n. 1, p. 14-22, 2014.

SOARES, R.M.; MARINGONI, A.C.; LIMA, G.P.P. Ineficiência de acibenzolar-S-metil na indução de resistência de feijoeiro à murcha-de-Curtobacterium. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 4, p. 373-377, 2004.

SOKOVIĆ, M. et al. Susceptibility of pathogenic bacteria and fungi to essential oils of wild *Daucus carota*. **Pharmaceutical Biology**, London, v. 47, n. 1, p. 38-43, 2009.

STANGARLIN, J.R. et al. Plantas Medicinais. **Biotecnologia: Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 2, n. 11, p. 16-24, 1999.

STANGARLIN, J.R.; PASCHOLATI, S.F. Proteção de plântulas de milho pipoca contra *Exserohilum turcicum* pelo uso de *Saccharomyces cerevisiae*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 20, n. 1, p. 16-21, 1994.

SUM, X. et al. Effects of Chitosan-Essential Oil Coatings on Safety and Quality of Fresh Blueberries. **Journal of Food Science**, Chicago v. 79, n. 5, p. 955-960, 2014.

- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**, 5<sup>o</sup> Edição. Sunderland: Sinauer Associates, 2015, 761p.
- TAO, N.; JIA, L.; ZHOU, H. Anti-fungal activity of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum*. **Food Chemistry**, Washington v. 153, n.1, p. 265-271, 2014.
- TAVARES, G.M. et al. Indução de resistência do mamoeiro à podridão radicular por indutores bióticos e abióticos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 11, p. 1416-1423, 2009.
- TERRY, L.A.; JOYCE, D.C. Elicitors of induced disease resistance in postharvest horticultural crops: A brief review. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 32, n. 1, p. 1-13, 2004.
- THEWES, F.R. et al. 1-methylcyclopropene effects on volatile profile and quality of 'Royal Gala' apples produced in Southern Brazil and stored in controlled atmosphere. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 45, n. 12, p. 2259-2266, 2015.
- TOMAZELI, V.N. **Indução de resistência a doenças em morangueiro com o uso de Acibenzolar-S-Metil e Harpina em pré e pós-colheita**. 2010. Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2010.
- UEDA, Y. et al. Inhibition of acetate ester biosynthesis in banana (*Musa sapientum* L.) fruit pulp under anaerobic conditions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 52, n. 6, p. 1615-1620, 2004.
- ULRICH, D. et al. Sensory Characteristics and Volatile Profiles of Parsley (*Petroselinum crispum* [Mill.] Nym.) in Correlation to Resistance Properties against Septoria Blight (*Septoria petroselini*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 59, n. 19, p. 10651–10656, 2011.
- VALDEBENITO -SANHUEZA, R.M. **Desinfecção de água e das câmaras frigoríficas para diminuição do inóculo de *Penicillium expansum***. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 1991. 20p. (Embrapa Clima Temperado. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 21).
- VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M.; BETTI, J.A. Doenças da Macieira (*Malus* spp.). In: **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. v. 2, 4 ed, São Paulo, p. 421-433, 2005.
- VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M. et al. **Características e controle da podridão-‘olho-de-boi’ nas maçãs do Sul do Brasil**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2006. (Circular Técnica, 66).
- VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M.; SPOLTI, P.; DEL PONTE, E.M. Controle do inóculo inicial para a redução dos danos pela podridão olho-de-boi em macieiras. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 32, n. 4, p. 1044 -1054, 2010.
- VALLAD, G.E.; GOODMAN, R.M. Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture. **Crop Science**, Madison, v. 44, n. 5, p. 1920–1934, 2004.
- VAN HUNG, P.; CHI, P.T.L.; PHI, N.T.L. Comparison of antifungal activities of Vietnamese citrus essential oils. **Journal Natural Product Research**, Abingdon, v. 27, n. 4-5, p. 506-508, 2013.
- VAN MEER, G.; VOELKER, D.R.; FEIGENSON, G.W. Membrane lipids: where they are and how they behave. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, Londres, v. 9, n. 2, p. 112-124, 2008.

VARUGHESE, T. et al. Chemical composition of the essential oils from stem, root, fruit and leaf of *Piper longum* Linn. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, San Francisco, v. 19, n. 1, p. 52-58, 2016.

VÉRONÉSI, C.; DELAVAUULT, P.; SIMIER, P. Acibenzolar-S-methyl induces resistance in oilseed rape (*Brassica napus* L.) against branched broomrape (*Orobanche ramosa* L.). **Crop Protection**, Surrey, v. 28, n. 1, p. 104–108, 2009.

WAEWTHONGRAK, W.; PISUCHPEN, S.; LEELASUPHAKUL, W. Effect of *Bacillus subtilis* and chitosan applications on green mold (*Penicillium digitatum* Sacc.) decay in citrus fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam v. 99, n. 3, p. 44–49, 2015.

WANG, H. et al. Effect of Shatangju (*Citrus reticulata* Blanco) essential oil on spore germination and mycelium growth of *Penicillium digitatum* and *P. italicum*. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, San Francisco, v. 15, n. 5, p. 715–723, 2012.

WANG, Y. et al. Postharvest ASM or Harpin treatment induce resistance of muskmelons against *Trichothecium roseum*. **Agricultura Science in China**, Pequim, v. 7, n. 2, p. 217–223, 2008.

WEI, Y.Z. et al. Differential expression of anthocyanin biosynthetic genes in relation to anthocyanin accumulation in the pericarp of Litchi chinensis Sonn. **PLOS ONE**, San Francisco, v. 6, n. 4, 2011.

WHEELER, S. et al. The relationship between the expression of abscisic acid biosynthesis genes, accumulation of abscisic acid and the promotion of *Vitis vinifera* L. berry ripening by abscisic acid. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, Adelaide, v. 15, n. 3, p. 195–204, 2009.

WISNIEWSKI, M. et al. Non chemical approaches to postharvest disease control. **Acta Horticulturae**, Wellington, v. 553, n. 1, p. 407–412, 2001.

WURYATMO, E.; KLIEBER, A.; SCOTT, E. Inhibition of citrus postharvest pathogens by vapor of citral and related compounds in culture. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington, v. 51, n. 9, p. 2637-2640, 2003.

XIA, J. et al. MetaboAnalyst 3.0 - making metabolomics more meaningful. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 43, n. 1, p. 251-257, 2015.

YOSHIDA, S.; UEMURA, M. Lipid composition of plasma membranes and tonoplasts isolated from etiolated seedlings of mung bean (*Vigna radiata* L.). **Plant Physiology**, Malden, v. 82, n. 3, p. 807-812, 1986.

YUSOFF, Z. M. et al. Characterization of down-flowing steam distillation system using step test analysis. **IEEE Control and System Graduate Research Colloquium**, Shah Alam, v. 1, n. 1, p. 197-201, 2011.

ZHANG, D. et al. Chitosan controls postharvest decay on cherry tomato fruit possibly via the mitogen-activated protein kinase signaling pathway. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 63, n. 33, p. 7399-7404, 2015.

ZHANG, D.; QUANTICK, P.C. Antifungal effects of chitosan coating on fresh strawberries and raspberries during storage. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, Abingdon, v. 73, n. 6, p. 763-767, 1998.

ZHANG, H.Y.; LI, R.P.; LIU, W.M. Effects of chitin and its derivative chitosan on postharvest decay of fruits: a review. **International Journal of Molecular Science**, Basel, v. 12, n. 2, p. 917-934, 2011.

ZHANG, Y. et al. Effect of volatile emissions, especially  $\alpha$ -pinene, from persimmon trees infested by Japanese wax scales or treated with methyl jasmonate on recruitment of ladybeetle predators. **Environmental Entomology**, Oxford, v. 38, n. 5, p. 1439-1445, 2009.

ZHANG, Z. et al. Multiple pre-harvest treatments with acibenzolar-S-methyl reduce latent infection and induce resistance in muskmelon fruit. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 130, n. 1, p. 126-132, 2011.

ZORRILLA-FONTANESI, Y. et al. Genetic analysis of strawberry fruit aroma and identification of O-methyltransferase FaOMT as the locus controlling natural variation in mesifurane content. **Plant Physiology**, Malden, v. 159, n. 2, p. 851-870, 2012.