



GUSTAVO STEFFEN DE ALMEIDA

**POTENCIAL DE ÓLEOS ESSENCIAIS NO CONTROLE DE
FUNGOS FITOPATOGÊNICOS EM PÓS-COLHEITA DE
MORANGO.**

CAMPINAS

2015



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

GUSTAVO STEFFEN DE ALMEIDA

**POTENCIAL DE ÓLEOS ESSENCIAIS NO CONTROLE DE
FUNGOS FITOPATOGÊNICOS EM PÓS-COLHEITA DE
MORANGO**

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL
DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO ALUNO
GUSTAVO STEFFEN DE ALMEIDA, E ORIENTADA PELA
PROFA. DRA. MARTA CRISTINA TEIXEIRA DUARTE.

Assinatura da orientadora

CAMPINAS

2015

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Claudia Aparecida Romano - CRB 8/5816

AL64p Almeida, Gustavo Steffen de, 1987-
Potencial de óleos essenciais no controle de fungos fitopatogênicos em pós-colheita de morango / Gustavo Steffen de Almeida. – Campinas, SP : [s.n.], 2015.

Orientador: Marta Cristina Teixeira Duarte.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Morango. 2. Óleos essenciais. 3. Atividade antifúngica. 4. *Colletotrichum gloeosporioides*. 5. *Botrytis cinerea*. I. Duarte, Marta Cristina Teixeira. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Potential of essential oils in phytopathogenic fungi control on post-harvest of strawberry

Palavras-chave em inglês:

Strawberry

Essential oils

Antifungal activity

Colletotrichum gloeosporioides

Botrytis cinerea

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Mestre em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Marta Cristina Teixeira Duarte [Orientador]

Marcos Nopper Alves

Flavio Luis Schmidt

Data de defesa: 23-04-2015

Programa de Pós-Graduação: Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte
Orientadora
Universidade Estadual de Campinas

Dr. Marcos Nopper Alves
Membro Titular
Universidade Estadual de Campinas

Prof. Dr. Flávio Luis Schmidt
Membro Titular
Universidade Estadual de Campinas

Dra. Eliane Aparecida Benato Rodrigues da Silva
Membro Suplente
Instituto Biológico

Profa. Dra. Priscilla Efraim
Membro Suplente
Universidade Estadual de Campinas

RESUMO

A cultura do morango é de grande importância no contexto agrícola mundial, com uma produção anual que supera 4,5 milhões de toneladas. Porém, as características desta fruta a tornam altamente susceptível a fatores físicos e biológicos de deterioração, tornando-a altamente perecível e acarretando altos níveis de perdas no campo e na pós-colheita. Dentre os fatores biológicos tem destaque a ação de fungos fitopatogênicos, dentre os quais o *Botrytis cinerea* e o *Colletotrichum gloeosporioides* tem papel principal. Dentre as alternativas naturais para controle destes fitopatógenos, os óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas vêm sendo investigados. Neste contexto, no presente trabalho a atividade antifúngica de óleos essenciais de nove espécies de *Citrus* e de *Cymbopogon citratus* foi avaliada *in vitro* contra *B. cinerea* e *C. gloeosporioides*. Os óleos de *Citrus sinensis* e *C. citratus* foram os mais ativos *in vitro* (MIC – 0,25 e 0,06 mg.mL⁻¹, respectivamente) e, portanto, selecionados para os ensaios com morangos *in natura*, visando manter sua qualidade pós-colheita. Os ensaios foram conduzidos sob duas condições ambientais, ou seja, sob condições ambiente de armazenamento (25 °C) e em armazenamento refrigerado (10 °C). Aplicados na concentração 1,0 mg.mL⁻¹, o óleo essencial de *C. sinensis* mostrou-se mais eficaz sob condições ambiente de armazenamento, e a mistura dos dois óleos em partes iguais em armazenamento refrigerado. Em ambas as condições, melhores resultados foram obtidos através da aplicação por contato direto. Os óleos essenciais foram ainda incorporados a um filme de revestimento composto por matriz de metil-celulose e testados *in vitro* quanto ao seu potencial de inibição de *B. cinerea*. Nestas condições, o óleo essencial de *C. sinensis* mostrou-se o mais eficiente. Através dos resultados foi possível concluir que os óleos essenciais são uma opção viável para o controle de fitopatógenos em morango e para manutenção de sua qualidade pós-colheita.

Palavras-chave: morango, óleos essenciais, atividade antifúngica, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Botrytis cinerea*

ABSTRACT

The strawberry crop has great importance in agricultural world wide context, with an annual production exceeding 4.5 million tons. However, the characteristics of this fruit make it highly susceptible to physical and biological damage, making it easily perishable and causing losses in field and postharvest. Among the biological factors, the action of phytopathogenic fungi such as *Botrytis cinerea* and *Colletotrichum gloeosporioides* have a main role. Natural alternatives have been proposed in order to replace synthetic products currently used in control of these plant pathogens, of which the essential oils from medicinal and aromatic plants have demonstrated good potential. In this context, the present study evaluated the *in vitro* antifungal activity of the essential oils from nine *Citrus* species and from *Cymbopogon citratus* against *B. cinerea* and *C. gloeosporioides*. *Citrus sinensis* and *C. citratus* essential oils showed highest activities (MIC values 0.25 mg.mL⁻¹ and 0.06 mg.mL⁻¹, respectively) and were selected for the assays with *in natura* strawberries aiming at maintaining its postharvest quality. The tests were conducted under two simulated environmental conditions, ie, environment conditions of storage (25 °C) and refrigerated storage (10 °C). The crude essential oil of *C. sinensis* (1.0 mg.mL⁻¹) was the more effective in environmental conditions of storage, and the mixture of the two oils (1:1 – 1.0 mg.mL⁻¹) in refrigerated storage. In both conditions, best results were obtained when the oils were applied by direct contact. The essential oils were also incorporated into a coating film consisting of methyl cellulose matrix and tested to their *in vitro* inhibitory potential against *B. cinerea*. Accordingly, the essential oil of *C. sinensis* proved to be the most effective as antifungal. The results allowed conclude that essential oils are a viable option for controlling phytopathogenic fungi in strawberry and for continuing postharvest quality.

Keywords: strawberry, essential oils, antifungal activity, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Botrytis cinerea*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 O Morango (<i>Fragaria spp</i>).....	3
2.1.1 Características botânicas e agronômicas.....	3
2.1.2 Morango no Brasil.....	4
2.1.3 Panorama mundial da produção de morangos.....	6
2.1.4 Características nutricionais.....	7
2.1.5 Fatores de influência na Pós-Colheita do morango.....	8
2.2 O gênero <i>Colletotrichum</i>	10
2.2.1. Antracnose.....	11
2.3 <i>Botrytis cinerea</i> e o mofo cinzento do morango.....	12
2.4 Óleos Essenciais e ação antimicrobiana.....	14
2.4.1 Efeito de óleos essenciais e extratos vegetais sobre fungos de importância agronômica e em alimentos.....	15
3. OBJETIVOS.....	18
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4.1 Avaliação do potencial antifúngico de nove espécies de <i>Citrus</i> e de <i>Cymbopogon citratus</i>	19
4.1.1 Fungos fitopatogênicos.....	19
4.1.2 Meios de cultura para manutenção dos fungos.....	19
4.1.3 Manutenção dos fungos e obtenção de esporos.....	19
4.1.4 Obtenção e diluição dos óleos essenciais.....	20
4.1.5 Atividade antifúngica dos óleos essenciais – Determinação da Concentração Mínima Inibitória.....	21
4.1.5.1 Preparo da suspensão de esporos.....	21
4.1.5.2 Teste de microdiluição.....	21
4.2 Determinação da composição química dos óleos essenciais por CG-EM – Cromatografia Gasosa acoplada a Detector Seletivo de Massas.....	22
4.3 Emprego de óleos essenciais como agentes antifúngicos em pós-colheita de morangos.....	22
4.3.1 Morangos.....	23
4.3.2 Preparo de esporos dos fungos e inoculação dos pseudofrutos.....	23
4.3.3 Condições Ambiente de Armazenamento.....	23

4.3.3.1	Aplicação do óleo essencial.....	24
4.3.3.2	Tratamentos.....	24
4.3.4	Armazenamento Refrigerado.....	25
4.3.4.1	Aplicação do óleo essencial.....	26
4.3.4.2	Tratamentos.....	26
4.3.5	Avaliação da infecção fúngica.....	27
4.3.6	Análise Estatística.....	28
4.3.7	Análises físico-químicas.....	29
4.3.7.1	Absorbância da polpa.....	29
4.3.7.2	Sólidos solúveis.....	29
4.3.7.3	Acidez titulável e pH.....	29
4.3.7.4	Perda de massa.....	30
4.4	Emprego dos óleos essenciais em revestimentos comestíveis para controle <i>de B. cinerea</i>	30
4.4.1	Manutenção do fungo e obtenção de esporos.....	30
4.4.2	Preparação do filme-revestimento.....	30
4.4.3	Dosagem dos óleos essenciais.....	31
4.4.4	Determinação da efetividade antimicrobiana dos revestimentos.....	32
4.4.5	Delineamento experimental.....	32
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
5.1	Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais contra os fungos deterioradores pós-colheita de morango.....	33
5.2	Caracterização química dos óleos essenciais selecionados.....	35
5.3	Emprego de óleos essenciais como agentes antifúngicos em pós-colheita de morangos.....	37
5.3.1	Teste sob Condições Ambiente de Armazenamento.....	37
5.3.2	Teste sob Armazenamento Refrigerado.....	43
5.4	Características físico-químicas.....	49
5.4.1	Perda de massa.....	49
5.4.2	Teor de sólidos solúveis, absorbância da polpa, pH e acidez total.....	50
5.5	Incorporação dos óleos essenciais em revestimentos comestíveis para controle do fungo <i>B. cinerea</i>	51
6.	CONCLUSÕES.....	52
7.	REFERÊNCIAS.....	54

“A Terra possui recursos suficientes para
prover as necessidades de todas as pessoas,
mas não a ganância de algumas”.

Mahatma Gandhi

AGRADECIMENTOS

À Vida, por ter me dado a oportunidade e as condições de participar, ainda que minimamente, da construção e desenvolvimento da Ciência em nosso país.

Agradeço aos meus pais, Ronaldo e Maria Helena, e ao meu irmão Ronaldo Filho por estarem sempre ao meu lado, me ajudarem sempre que necessitei e me encorajarem quando, por vezes, me senti desanimado.

À Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte, por me incentivar e manter-se sempre confiante no desenvolvimento do trabalho. Também por sua paciência e discernimento em minha orientação.

Aos pesquisadores, técnicos e funcionários do CPQBA por terem provido todo o auxílio que se fez necessário para a realização de meu trabalho, em especial aos Drs. Alexandre Ponezi, Marcos Alves e Adilson Sartoratto.

À Dra. Eliane Benato pelos aconselhamentos na elaboração do trabalho.

À Me. Adriana Figueiredo pelos ensinamentos em estatística e à Lídia Souza pela ajuda com as correções gramaticais.

Aos professores e professoras da FEA, que me ensinaram muito durante a realização das disciplinas e no convívio diário, e aos funcionários da UNICAMP, sem os quais nenhuma atividade acadêmica seria possível.

Às Dras. Maria Vargas Colás e Ángela Perdones, da Universidade Politécnica de Valência, por me darem a oportunidade de desenvolver atividades de pesquisa em seu laboratório e por me receberem tão bem em minha estadia na Espanha.

Aos amigos e amigas que fiz durante o curso de mestrado, no laboratório e nas salas de aula. Alessandra, Caroline, Flávia, Laura, Gustavo, Leo, Bruno, Paula, Ana Paula, Naiara, Camila, Gilberto, Ângela, Patrícia e muitos outros.

Aos familiares e amigos de longa data que sempre estiveram presentes em minha vida.

Aos amigos e amigas da República Maracangalha, da ESALQ/USP, com os quais aprendi mais do que em qualquer escola.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de mestrado.

À banca avaliadora pelas valiosas contribuições para o aprimoramento deste trabalho.

A todos e todas que, de alguma forma, contribuíram.

1. INTRODUÇÃO

A cultura do morango é de grande importância no panorama agrícola mundial. O Brasil, no entanto, responde por apenas 1,5% do total produzido, aproximadamente. Nosso país, com clima predominantemente tropical faz com que haja dificuldades em se obter melhorias na produtividade desta fruta, mais adaptada às zonas temperadas. Por seu caráter bastante perecível, o morango está ainda sujeito a grandes perdas em toda sua cadeia de produção e distribuição, principalmente devido aos micro-organismos fitopatogênicos e deterioradores. Por estas razões, o preço dos morangos é elevado em nosso país e sua disponibilidade muitas vezes incerta. Deste modo, alternativas que visem promover uma maior durabilidade aos morangos, prolongando seu tempo de vida pós-colheita são requeridas pelo setor agrícola e da agroindústria.

Por outro lado, com o aumento da preocupação com o caráter potencialmente nocivo que resíduos de compostos químicos sintéticos, tais como fungicidas podem apresentar ao organismo humano, cada vez mais são buscados meios naturais de controle de patógenos de frutas e hortaliças, sem a necessidade de utilização destes compostos.

Nesse contexto, surge como uma alternativa viável os óleos essenciais produzidos por plantas medicinais e aromáticas. Estes compostos naturais, de composição química bastante variada e produzidos através do metabolismo secundário das plantas têm apresentado grande potencial para controle de diferentes tipos de micro-organismos, com destaque para os fungos fitopatogênicos. Dentre estes, podemos destacar os agentes da antracnose e do mofo cinzento, os fungos *Colletotrichum gloeosporioides* e *Botrytis cinerea*, que estão entre os maiores responsáveis pelas perdas de morangos pré e pós-colheita (LORENZETTI et al., 2011; NABIGOL & MORSHEDI, 2011; RAHMAN et al., 2011).

O gênero *Colletotrichum* é bastante importante para a agricultura, pois suas espécies atuam sobre uma vasta gama de plantas cultivadas, com destaque para as frutas e hortaliças. Além disso, possui uma grande diversidade de ação, podendo afetar diferentes partes das plantas ainda no campo, e continuar afetando os produtos alimentícios delas provenientes depois de colhidos (SMITH, 2013; SUTTON, 1992). Deste modo, esse gênero sempre mereceu grande atenção nas pesquisas que tratam do controle de fungos fitopatogênicos.

O *Botrytis cinerea* é também outro fungo bastante disseminado e com grande potencial deteriorador da produção agrícola no campo, na comercialização e consumo. Sua relativa tolerância às baixas temperaturas faz com que possa desenvolver-se mesmo em ambientes climatizados, o que confere um desafio a mais ao intuito de contê-lo (TANAKA et al, 2005; SUTTON, 1998).

Levando-se em conta todos estes aspectos, novas pesquisas vêm sendo realizadas com o objetivo de encontrar óleos essenciais com efeito antifúngico e sem toxicidade. Estas pesquisas também incluem o manejo adequado de aplicação, visando o melhor aproveitamento e menor desperdício.

Desta maneira, o objetivo do presente trabalho foi avaliar óleos essenciais de *Citrus* spp e de *Cymbopogon citratus* (capim-limão) quanto ao potencial para aumentar a vida de prateleira de morangos, facilitando sua comercialização e diminuindo as perdas.

Muitos trabalhos realizados demonstraram ação importante de óleos essenciais sobre os mais diversos fungos fitopatogênicos, dentre eles *B. cinerea* e *C. gloeosporioides*. A possibilidade de obtenção desses óleos essenciais a partir de subprodutos da agroindústria é de grande interesse, como no caso das cascas das frutas de *Citrus* spp. ou das folhas de *Eucalyptus* spp., por exemplo. Além disso, por tratar-se de produtos completamente incorporados à alimentação humana, presume-se apresentarem baixos níveis de toxicidade, sendo, portanto, passíveis de utilização em produtos comestíveis. O conhecimento tradicional ligado ao uso de óleos essenciais é também outro aspecto relevante e pode inclusive servir de guia para as pesquisas científicas.

A composição química complexa apresentada pelos óleos essenciais tem sido relacionada com sua ação antimicrobiana e, por outro lado, responsável pela dificuldade de aquisição de resistência por parte dos micro-organismos, o que é devido ao chamado efeito sinérgico (DUARTE et al, 2012a; BURT, 2004).

O uso de óleos essenciais na agricultura e em alimentos é proeminente e tende a ser cada vez mais uma realidade no cenário global da alimentação (FISHER & PHILLIPS, 2008). É uma atitude promissora visando encontrar alternativas cada vez mais eficientes no intuito de melhorar a quantidade e qualidade dos alimentos produzidos e permitir o acesso de todas as pessoas a uma alimentação adequada e saudável, caminhando rumo à efetiva segurança alimentar.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Esta revisão aborda informações sobre a cultura do morangueiro, principais doenças pós-colheita e um panorama da situação atual dos estudos sobre óleos essenciais no controle de fitopatógenos.

2.1. O Morango (*Fragaria* spp.)

2.1.1. Características botânicas e agronômicas.

O morangueiro (*Fragaria* spp.) é uma planta botanicamente classificada como pertencente à ordem Rosales, Família Rosaceae, subfamília Rosidaeae, tribo Potentillae (VIDAL & VIDAL, 2003).

Segundo Darrow (1966), existem mais de 20 espécies do gênero *Fragaria*, popularmente conhecidas como morangueiro. Estas se distribuem naturalmente nas zonas temperadas e subtropicais, uma vez que a planta é pouco adaptada aos climas quentes. No entanto, o morangueiro é hoje cultivado em todos os continentes, devido aos esforços realizados no âmbito do melhoramento genético da planta, visando adaptá-la às mais diversas condições edafoclimáticas (RESENDE et al., 1999).

Nos dias atuais, o morangueiro tipicamente cultivado é o *Fragaria x ananassa* Duch., que originou-se do cruzamento entre as espécies silvestres *Fragaria chiloensis* e *Fragaria virginiana* (SILVA et al., 2007).

De acordo com a descrição de Sanhueza et al. (2005), o morangueiro é uma planta herbácea estolonífera, perene, com caule subterrâneo conhecido como coroa. Esta coroa apresenta um tecido condutor periférico unido às folhas nos dois sentidos. A medula é proeminente. As folhas se originam da coroa de forma helicoidal sendo, em geral, trifoliadas com um par de estípulas triangulares na base. As folhas têm entre 300 e 400 estômatos/mm², o que faz com que a planta seja bastante sensível à falta d'água e baixa umidade relativa do ar, assim como alta temperatura ou incidência de luz. As flores são hermafroditas e hemicíclicas, sendo o cálice formado por brácteas unidas na base. As pétalas são livres, lobuladas, brancas ou avermelhadas, dispostas ao redor do receptáculo

proeminente. Este receptáculo, após a fecundação dos pistilos, se transforma no morango. Assim, os morangos são frutos falsos, sobre os quais se encontram os aquênios, os frutos verdadeiros.

O morango é classificado como uma fruta não climatérica que leva cerca de 30 dias para atingir tamanho e maturidade desejáveis (CORDENUNSI, 2002). De acordo com Pineli (2009), a definição do ponto de colheita do morango é uma das operações mais importantes em seu ciclo natural, uma vez que exerce influência direta na durabilidade pós-colheita da fruta. Os frutos do morangueiro são bastante frágeis e delicados, por causa de sua epiderme delgada, grande porcentagem de água e alto metabolismo. Tais características exigem cuidados na hora da colheita.

De acordo com Ueno (2004), muitos são os fatores que podem afetar e mesmo inviabilizar a cultura do morangueiro. Cabe destacar a umidade relativa do ar, o fotoperíodo, as características do solo, a temperatura e pragas e doenças. A incidência de pragas e doenças é, direta ou indiretamente, influenciada pelos demais fatores. Os agentes causais das doenças associadas ao morangueiro podem ser vírus, bactérias, fungos e nematoides. É importante salientar que alguns patógenos afetam o morangueiro no campo, outros os morangos na pós-colheita e outros em ambas as situações.

De acordo com a revisão feita por Ueno (2004), existem mais de 50 fungos, três bactérias, 26 vírus e oito nematoides causadores das principais doenças relacionados ao morangueiro. Neste tema, os fungos merecem maior atenção. A Tabela 1 mostra as espécies fitopatogênicas mais importantes.

2.1.2. **Morango no Brasil**

No Brasil, a cultura do morangueiro apresenta importância considerável e se expande a cada ano. Segundo o histórico levantado por Castro (2004), a cultura passou a receber incentivos no país a partir da primeira metade do século XX, inicialmente concentrando-se no Rio Grande do Sul. Introduzido em São Paulo, o cultivo do morango desenvolveu-se comercialmente a partir da década de 60. Em seguida, a cultura passou a ser expandida, chegando a Minas Gerais, Goiás, Paraná e Santa Catarina. Atualmente a produção vem crescendo no Espírito Santo e no Distrito Federal.

Tabela 1. Principais doenças fúngicas do morangueiro e agentes causais.

Doença fúngica	Agente causal
Antracnose	<i>Colletotrichum</i> spp.
Mancha de Micosferela	<i>Mycosphaerella fragariae</i>
Mancha da Dendrofoma	<i>Dendrofoma obscurans</i>
Mancha de Diplocarpon	<i>Diplocarpon earlianum</i>
Podridão de Phytophthora	<i>Phytophthora cactorum</i>
Murcha de Verticillium	<i>Verticillium dahliae</i>
Oídio	<i>Sphaerotecha macularis</i>
Mofo cinzento	<i>Botrytis cinerea</i>

Fontes: Lopes (2011); Gouvea et al. (2009); Ueno (2004); Reddy et al.(2000).

Desde sua inserção como cultura agrícola, o morango vem passando pelo processo de melhoramento genético, onde se buscam qualidades específicas como melhoria de rendimento, características das frutas e resistência ao frio e pragas. Castro (2004) destaca, dentre as principais cultivares de morangueiro desenvolvidas no Brasil, as cultivares: ‘Campinas’, ‘Jundiaí’, ‘Princesa’, ‘Cascata’, ‘Monte Alegre’, ‘Konvoy’, ‘Guarani’, ‘AGF-80’, ‘Piedade’, ‘Aromas’, ‘Princesa Isabel’, ‘BR-1’, ‘Vila Nova’, ‘Bürkley’ e ‘Santa Clara’. Da mesma maneira, algumas cultivares desenvolvidos fora do país foram também introduzidas nos campos brasileiros. Pode-se destacar: ‘Alemanha’, ‘Poca Hontas’, ‘Lassen’, ‘Reiko’, ‘Sequóia’, ‘W.M. Belt’, ‘Tioga’, ‘Selva’, ‘Chandler’, ‘Pajaro’, ‘Fern’, ‘Irvine’, ‘Dover’, ‘Oso Grande’, ‘Tudla’, ‘Camarosa’ e ‘Seascape’. Segundo Antunes & Reisser-Júnior (2007), as cultivares mais produzidas no Brasil são: ‘Oso Grande’ (54%); ‘Camarosa’ (20%); ‘Dover’ (6%); ‘Aromas’ (4%).

O sistema de produção mais difundido no Brasil é o protegido com túnel baixo e com sistema de fertirrigação. Há regiões, no entanto, que permitem o cultivo a céu aberto sem proteção, devido à ausência de chuvas durante a colheita e de geadas. Tem sido observado também o aumento da produção fora do solo, em sistemas horizontais ou verticais (ANTUNES & REISSER-JUNIOR, 2007).

No que se refere à produção de morango em nosso país, o último Censo Agropecuário, referente ao ano de 2006 (IBGE, 2012), revelou a produção de 72245

toneladas da fruta, correspondendo a um valor de produção superior a 155 milhões de reais. Os maiores produtores foram Minas Gerais (40245 t); Rio Grande do Sul (9819 t), Paraná (6265 t) e São Paulo (5030 t). As informações sobre a área cultivada são ainda conflitantes e imprecisas. Oliveira & Scivittaro (2009) estimaram a área de produção nacional em 3,5 mil ha. Antunes & Reisser Júnior (2007) citaram os três estados com maior área cultivada como sendo Minas Gerais (1500 ha); São Paulo (800 ha) e Rio Grande do Sul (385,6 ha).

2.1.3. Panorama mundial da produção de morangos

Segundo o levantamento mais atual da FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*), a produção de morangos no mundo atingiu no ano de 2012 mais de 4,51 milhões de toneladas, utilizando-se para isso uma área cultivada superior a 243 mil hectares (FAOSTAT, 2012). O continente americano é o principal responsável pela produção global, correspondendo a 42,8% do total. Como descrito na Tabela 2, o maior produtor de morango a nível mundial são os EUA, seguidos pelo México.

Tabela 2. Principais países produtores de morango em 2012.

País	Produção de morango (t)
1. EUA	1366850
2. México	360426
3. Turquia	353173
4. Espanha	289900
5. Egito	242297
6. Coreia do Sul	192140
7. Japão	185000
8. Rússia	174000
9. Alemanha	155828
10. Polônia	150151

Fonte: FAOSTAT (2012)

2.1.4. Características nutricionais.

O morango é uma fruta muito apreciada por suas características sensoriais. No entanto, indo mais além, destacam-se os potenciais benefícios à saúde relacionados à sua composição nutricional. Cordenunsi et al. (2002) encontraram que em torno de 90% da composição da fruta corresponde à água. Sanhueza et al. (2005) determinaram a composição nutricional média do morango, sendo os valores constantes da Tabela 3.

Segundo Hannum (2004), o morango apresenta compostos com ação antioxidante, atividade anti-inflamatória e potencial anticarcinogênico e antineurodegenerativo. Os principais responsáveis por esses potenciais são a vitamina C e os compostos fenólicos presentes na fruta (ROCHA et al., 2008; CORDENUNSI et al., 2002).

Tabela 3. – Valor nutricional médio do morango.

Informação Nutricional	Quantidade / 100g
Valor energético (kcal)	39,00
Glicídios (g)	7,40
Lipídeos (g)	0,60
Proteínas (g)	1,00
Cálcio (mg)	22,00
Fósforo (mg)	0,90
Potássio (mg)	155,20
Sódio (mg)	31,50
Cobre (mg)	0,20
Iodo (mg)	0,16
Zinco (mg)	0,23
Enxofre (mg)	11,50
Vitamina A (µg)	3,00
Vitamina B1 (µg)	30,00
Vitamina B2 (µg)	0,40
Niacina (µg)	0,40
Vitamina C (µg)	72,80

Fonte: Adaptado de Sanhueza et al. (2005).

Os principais compostos fenólicos encontrados no morango são o ácido elágico e os flavonoides, dentre os quais se ressaltam as antocianinas, a catequina, a quercetina e o kaempferol (HANNUM, 2004).

Cordenunsi et al. (2002) determinaram a concentração dos compostos fenólicos em 6 diferentes cultivares de morango: ‘Mazi’, ‘Oso Grande’, ‘Dover’, ‘Pajaro’, ‘Toyonoka’ e ‘Campineiro’. As concentrações do ácido elágico variaram de 0,90 a 1,87 mg por 100 g de peso fresco. Já entre as concentrações de flavonoides totais houve uma variação de 2,67 à 7,11 mg por 100 g de peso fresco da fruta. Dentre as cultivares estudadas, a ‘Oso Grande’ foi a que demonstrou os maiores valores nos dois parâmetros observados. Rocha et al. (2008) ressaltaram também a importância dos minerais presentes no morango para a saúde humana. Foram detectados e quantificados os níveis de ferro, manganês, zinco e cobre em três cultivares estudadas (‘Oso Grande’, ‘Aromas’ e ‘Toyorrinho’). A cv. Oso Grande foi a que apresentou maiores índices dos quatro metais, respectivamente 62,02; 52,74; 16,37 e 5,81 mg.kg⁻¹ da fruta.

2.1.5. Fatores de influência na pós-colheita do morango.

Apesar de ser uma fruta muito apreciada por suas condições sensoriais e com indicativo de funcionalidade, o consumo de morango é afetado pela oferta irregular da fruta, o que se deve principalmente à sua alta perecibilidade. Como ressaltam Cantillano (2004), por ser um tecido vivo, as frutas estão sujeitas a processos fisiológicos e físicos de importância em pós-colheita, como a transpiração e a respiração. No caso do morango, a maioria desses processos não é desejável, pois contribui para a perda de sua qualidade. Segundo Lima (1999), o morango possui uma alta taxa respiratória, o que significa que o pseudofruto tem uma atividade metabólica alta, consumindo muito oxigênio e produzindo dióxido de carbono, o que contribui para o encurtamento da vida pós-colheita. A alta taxa de respiração apresentada pelo morango foi confirmada por Yamashita et al. (2006), que identificaram taxas de respiração da ordem de 71 mgCO₂ por quilo de fruta por hora, a 12 °C. Além disso, os danos mecânicos, feridas e batidas, que ocorrem durante toda sua cadeia de distribuição, deixam o pseudofruto muito susceptível à ação de micro-organismos, acarretando perdas nutritivas, qualitativas e econômicas (KADER, 2002).

Como citado anteriormente, os morangos pertencem ao grupo dos frutos não climatéricos, o que significa que são colhidos próximo de seu ponto máximo de amadurecimento, sendo que não há um incremento em suas qualidades sensoriais após a colheita (CHITARRA & CHITARRA, 2005). Em decorrência dos fatores elencados, o processo de senescência do morango é acelerado, daí decorrendo sua curta vida pós-colheita, que usualmente não passa de alguns dias. Isso ocorre por inanição, ou seja, o pseudofruto não pode mais ser abastecido de nutrientes e água, como ocorria quando estava na planta (LIZANA, 1975).

Outro fator importante que afeta o morango é a transpiração, que consiste na perda de água na forma de vapor dos tecidos do pseudofruto. Segundo Cantillano (2004) esse processo é importante porque provoca perdas qualitativas e quantitativas do produto, uma vez que causa perda de massa, enrugamento, ressecamento e amolecimento do pseudofruto. Ressalta-se o fato de que o morango não possui uma camada epidérmica protetora que dificultaria a perda de água.

No Brasil, as perdas na pós-colheita do morango, por todos os fatores, se encontram em torno de 39% das frutas comercializadas (SOARES, 2009). Deste modo, é fundamental o manuseio e a conservação corretos dos morangos na colheita e pós-colheita. Segundo Galegário et al. (2005), a colheita do morango deve ser realizada nas horas menos quentes do dia. Os pseudofrutos devem ser acondicionados nos contentores com o máximo de cuidado e resfriados o mais rapidamente possível, em no máximo duas horas após a colheita. É aconselhável também uma pré-seleção dos morangos ainda no campo, separando os sadios daqueles que demonstram qualquer traço de lesão ou podridão e que podem apresentar-se como fonte de inóculo de micro-organismos deterioradores. Ainda segundo os autores, no caso do produto para consumo *in natura*, o ideal é a colheita ser realizada na própria caixa onde os morangos serão comercializados. É recomendado o uso de embalagens PET (polietileno tereftalato) com furos na tampa, ou cobertas com filme plástico de PVC (policloreto de vinila). Fator preponderante na qualidade do produto no mercado é o cuidado no manuseio dos morangos durante toda a cadeia de distribuição. O armazenamento ideal é realizado a baixas temperaturas, de 0 à 1 °C, sob umidade relativa acima de 90%. Atmosferas modificadas, com maiores concentrações de CO₂ e menores de O₂ têm também efeito benéfico sobre a manutenção da qualidade do produto, desde que

respeitados determinados limites para evitar a ocorrência de processos fermentativos. A cadeia do frio deve ser mantida pelo máximo de etapas possível durante a distribuição.

Para o presente trabalho, o fator preponderante a ser levado em conta é a ação de fungos deterioradores como causadores de perdas pós-colheita. As principais espécies causadoras de podridões ou doenças na pós-colheita do morango são: *Rhizopus stolonifer*, *Penicillium digitatum*, *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea* e *Colletotrichum spp.*, ainda que outras espécies também tenham sido registradas causando danos pós-colheita à fruta, como *Rizoctonia solani*, *Phytophthora spp.*, *Sclerotia sclerotiorum*, *Pestalotia*, *Mucor spp.*, *Gnomonia comari* e *Alternaria spp.* (TANAKA et al., 2005; NABIGOL & MORSHEDI, 2011; LOPES, 2011). Conhecer a etiologia das doenças e o comportamento dos diferentes patógenos, assim como a magnitude de seus danos é de grande importância para se formular estratégias de controle eficientes na minimização de seus impactos (LOPES, 2011).

2.2. O gênero *Colletotrichum*

Os fungos do gênero *Colletotrichum* (ordem Melancoliales, classe Coelomycetes) caracterizam-se pela formação de estruturas de frutificação setosas, denominadas acérvulos, nas quais conídios hialinos são produzidos em massa alaranjada ou creme. Os conídios se apresentam envolvidos por uma matriz gelatinosa, composta por proteínas e polissacarídeos, que os protege da dessecação, propiciando maior eficiência de germinação e uma maior penetração no tecido da planta hospedeira. A germinação dos conídios se dá somente na presença de água livre ou sob alta umidade relativa (acima de 90%) (MENEZES, 2006). De acordo com Mishra & Siradhana (1979 apud MENEZES, 2006), a viabilidade dos conídios é curta e por isso eles não podem ser considerados estruturas de sobrevivência, ao contrário do micélio que pode permanecer viável por longos períodos em sementes infectadas ou infecções latentes assintomáticas em plantas. Algumas espécies são ainda capazes de formar esclerócios, que possuem elevada durabilidade.

Segundo Sutton (1992), existem cerca de 40 espécies aceitas de *Colletotrichum*. O *C. gloeosporioides* (Penzig) Penzig & Sacc merece destaque por ser uma espécie

amplamente disseminada. Foi denominada como a fase anamórfica de *Glomerella cingulata* (Stonem.) Spauld & Schrenk (MENEZES, 2006).

2.2.1 Antracnose

Dentre as doenças que afetam o morangueiro tem especial importância a antracnose, causada por diferentes espécies de fungos do gênero *Colletotrichum*: *C. acutatum*, *C. fragariae* e *C. gloeosporioides* (HOWARD et al. 1992). A doença pode ocorrer tanto no campo (SMITH, 2013) quanto nas frutas em pós-colheita (PERES et al., 2002). A antracnose ocorre não apenas no morangueiro, mas em muitas culturas frutíferas, sendo que diversas espécies de *Colletotrichum* foram identificadas como agentes fitopatogênicos (SMITH, 2013).

Os primeiros registros de *C. acutatum* identificado como causador da antracnose foram feitos por Simmonds (1965 apud SMITH, 2013) na Austrália. Já o *C. fragariae* foi primeiramente identificado como causador de antracnose em 1931, nos EUA por Brooks (1931 apud SMITH, 2013). Hoje, os agentes causais se encontram dispersos em amplas regiões de nosso planeta (SMITH, 2013).

Apesar de haver casos registrados desde a década de 80 quanto à presença da antracnose no Brasil (IGARASHI, 1984), somente em 1992 foi confirmado o agente causal, no caso o *C. acutatum* (HENZ et al. 1992).

Tanaka & Passos (2002) ressaltaram que a doença pode ser limitante para a cultura do morangueiro, devido à sua natureza devastadora, à susceptibilidade das cultivares mais utilizadas e à baixa eficiência das medidas de controle a que se dispõe atualmente, como a utilização de fungicidas, a remoção de partes infectadas do morangueiro e a proteção da planta contra danos causados por intempéries ambientais.

Existem diversas variantes da antracnose, identificadas de acordo com os sintomas apresentados pela planta. Isso se deve ao fato das diferentes espécies de *Colletotrichum* afetarem partes específicas do morangueiro. A espécie *C. acutatum* está mais comumente relacionada à podridão dos pseudofrutos e inflorescências, enquanto *C. fragariae* e *C. gloeosporioides* costumam causar lesões aos pecíolos e estolhos e a chamada podridão da coroa (TANAKA & PASSOS, 2002; SMITH, 2013). Não obstante, Howard et al. (1992)

relataram que é possível encontrar as três espécies numa mesma planta. Quando incide no rizoma, a doença é conhecida como “chocolate” ou “coração vermelho” em virtude da cor da podridão que provoca (TANAKA & PASSOS, 2002). Já nas situações em que afeta flores e pseudofrutos, recebe o nome de “flor-preta” (UENO, 1996).

Segundo Ueno (1996), a doença é bastante séria e pode causar significativas quedas na produção, como ocorrido em 1989 no Distrito Federal, quando produtores relataram perdas da ordem de 30 a 68 % em sua produção.

De acordo com Freeman et al. (1998), as perdas econômicas mais significativas provocadas por espécies de *Colletotrichum* ocorrem na pós-colheita. O processo inicia-se comumente ainda no campo. Ocorre a germinação de conídios do fungo depositados na superfície da fruta, procedido pela elongação do tubo germinativo e diferenciação com a consequente produção de estruturas denominadas apressórios, essenciais para que o fungo possa penetrar a cutícula e a parede celular do hospedeiro (PERES et al., 2005). Dá-se assim a instalação de infecções quiescentes, que são uma resposta do patógeno a condições adversas ao seu desenvolvimento. Está relacionada ao processo, a falta de nutrientes essenciais ao crescimento do fungo, a presença de compostos antifúngicos nas plantas e a produção de etileno. Tais infecções mantêm-se em estado de latência até iniciar-se o processo de amadurecimento do pseudofruto, onde os nutrientes passam a estar mais disponíveis e as condições mais favoráveis (PRUSKY, 1996).

A característica típica da antracnose na pós-colheita de frutas é o aparecimento de tecidos necróticos afundados na epiderme, apresentando coloração alaranjada devido à produção dos conídios (PERES et al., 2002).

2.3. *Botrytis cinerea* e o mofo cinzento do morango.

O mofo cinzento, causado pelo fungo *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. (ordem Helotiales, classe Leotiomycetes), é uma das mais importantes doenças do morango (SUTTON, 1998 apud XU et al., 2012). A ação do fungo pode afetar seriamente a produtividade e a qualidade pós-colheita do morango (THOMPSON, 2003).

O mofo cinzento do morango, como também é conhecida a doença, está disperso praticamente em todas as regiões produtoras de morangos. Afeta as frutas ainda no pé,

causando significativas perdas pré-colheita, mas pode afetar também as frutas no pós-colheita por via de infecções quiescentes geradas ainda no campo que continuam a se desenvolver durante o armazenamento e transporte, mesmo em baixas temperaturas (MERTELY & PERES, 2009). Segundo Kerling (1964 apud XU et al., 2012), *B. cinerea* tem a capacidade de manter-se quiescente em diferentes partes do morangueiro, não apresentando sintomas no campo, mas manifestando-os no pseudofruto no momento de comercialização.

Segundo Xu et al. (2012) as fontes de inóculo compreendem principalmente esclerócios do fungo presentes nos diferentes tecidos do morangueiro, que se tornam conídios em estações da alta umidade. A presença de morangos podres no solo é um importante foco de disseminação de esclerócios, no entanto as fontes de inóculo podem variar grandemente conforme a região e o método de cultivo. Ainda segundo os autores, a dispersão dos conídios se dá tanto pelo vento quanto pela chuva, assim como pelo manuseio das mudas e frutas.

A incidência da infecção por *B. cinerea* está altamente relacionada com as condições encontradas na pré-colheita do pseudofruto. Condições de umidade superiores a 80% a 15-20 °C e o acúmulo de chuvas no período que antecede a colheita estão fortemente correlacionados com a incidência da doença, de acordo com o levantamento de Xu et al. (2012).

As flores do morangueiro são altamente suscetíveis ao *B. cinerea*, pois seu pólen é um estimulante da germinação dos conídios do fungo (XU et al., 2012). Muitas vezes, entretanto, os sintomas aparecem posteriormente, nas frutas. As frutas verdes são bastante resistentes à infecção, mas a susceptibilidade aumenta com o amadurecimento (MERTELY & PERES, 2009). A temperatura ótima para o crescimento do fungo se dá ao redor de 20 °C, sendo que abaixo de 15 °C e acima de 25 °C ocorre considerável diminuição do potencial de infecção (XU et al, 2012).

Segundo a descrição de Mertely & Peres (2009) as lesões começam pequenas e firmes, com pontos amarronzados que aumentam rapidamente. Com o aumento da umidade, da qual decorre a esporulação, as manchas se tornam de cor bronze à cinza, exatamente em função da cor da massa de conídios. Surgem então alguns pontos de maior

concentração de esporos, chamados de “puffs”. Com o tempo, o *B. cinerea* consome e mumifica toda a fruta.

Comumente o controle do *B. cinerea* é feito com a convergência de medidas culturais e uso de fungicidas. As medidas culturais consistem em selecionar cultivares mais resistentes a ação do fungo e na remoção das partes infectadas da planta. No entanto, não há cultivares totalmente resistentes ao mofo cinzento. O uso dos fungicidas visa suprimir a esporulação do fungo e a proteção das flores, que são a principal via de infecção das plantas (MERTELY & PERES, 2009). No entanto, Diánez et al (2002) relataram haver a capacidade de desenvolvimento de resistência do fungo a muitos agrotóxicos.

Cabe destacar que a aplicação dos fungicidas pode ser evitada se adotadas práticas de manejo que visem à formação de um agroecossistema equilibrado, como o buscado nos cultivos orgânicos do morango. Neste contexto, o uso de extratos naturais e óleos essenciais pode adquirir um papel importante no controle de doenças para a produção de morangos que dispense o uso de agroquímicos sintéticos (DAROLT, 2008; DIAS-ARIEIRA et al., 2010).

2.4. Óleos Essenciais e ação antimicrobiana.

Óleos essenciais podem ser definidos como misturas complexas de compostos voláteis produzidos por diversos vegetais. Estes podem estar presentes em diversas partes da planta, podendo ser obtidos através de métodos físicos como prensagem e destilação (SIMÕES et al., 2007). São encontrados com diferentes concentrações de hidrocarbonetos terpênicos, alcoóis simples e terpênicos, cetonas, aldeídos, fenóis, ésteres, peróxidos e outros. Assim sendo, há uma considerável variação na composição química dos óleos essenciais (BASER & BUCHBAUER, 2010).

Muitos trabalhos vêm mostrando o potencial que diversos óleos essenciais, assim como extratos naturais de plantas, têm de inibir o crescimento de fungos e outros fitopatógenos (VILELA et al., 2009; VIUDA-MARTOS et al., 2008, CACCIONI et al., 1998, WILSON et al., 1997). Dentro de um cenário de crescente desconfiança no que diz respeito ao uso de agrotóxicos, principalmente em decorrência de seus potenciais riscos à saúde e ao ambiente, tais estudos vêm buscando fornecer subsídios para possibilitar a

substituição gradual do uso de agroquímicos sintéticos por produtos advindos de recursos naturais. Deste modo, a prospecção de compostos é uma área que pode ser de grande valia na busca por uma agricultura saudável e efetivamente sustentável em nossa sociedade.

2.4.1. Efeito de óleos essenciais e extratos vegetais sobre fungos de importância agrônômica e em alimentos.

Diversos fungos são alvo de estudos visando seu controle por óleos essenciais. Dentre estes cabe destacar aqueles que têm importância enquanto fitopatógenos, deterioradores de alimentos ou produtores de micotoxinas. Especificamente quanto aos fungos abordados neste trabalho, diversos estudos merecem destaque pelos resultados encontrados. De igual maneira, são dignos de atenção os trabalhos que objetivaram manter a qualidade pós-colheita do morango pela aplicação de óleos e extratos de plantas e aqueles que utilizaram os óleos essenciais aqui estudados com a finalidade de controle fúngico.

Cordero et al. (2011) avaliaram a ação de extratos etanólicos de seis espécies de plantas sobre cepas de *Colletotrichum* sp. causadoras de antracnose em inhame. Como conclusão encontraram que as espécies *Melia azederach* (cinamomo) e *Mascagnia concinna* tiveram ação sobre o fungo, similar ao controle positivo feito com fungicida sintético comercial. Rahman et al. (2011) demonstraram *in vitro* o efeito de extratos metanólicos da fruta *Jatropha curcas* (pinhão-mansão) sobre *C. gloeosporioides*, causador de antracnose em mamão, relatando inibição de até 78% do crescimento fúngico.

Domingues et al. (2011) testaram diferentes extratos de plantas e basidiomicetos nativos do Brasil sobre três fungos potencialmente nocivos ao morango, *C. acutatum*, *Alternaria solani* e *Sclerotium rolfsii*. O extrato do cogumelo *Oudemansiella canarii* foi o que demonstrou melhor efeito inibitório contra os fungos, diminuindo o crescimento radial em até 84% e inibindo totalmente a germinação de esporos. Nenhum efeito foi observado, no entanto, quanto à aplicação dos extratos das fanerógamas *Senna spectabilis* (acácia) e *S. multijuga* (canafistula).

Onze extratos provenientes de plantas medicinais foram testados por Almeida et al. (2009) no combate a *Colletotrichum spp.* enquanto agente causal de antracnose do

morangueiro. Dentre todos, demonstraram efeito fungitóxico *Ruta graveolens* (arruda), *Artemisia absinthium* (losna), *Nicotiana tabacum* (fumo) e *Allium sativum* (alho).

Foram testados os óleos essenciais de *Thymus danensis* e *T. carmanicus* sobre quatro fitopatógenos importantes ao morango: *R. stolonifer*, *P. digitatum*, *Aspergillus niger* e *B. cinerea*. Os resultados indicaram que tanto no ensaio *in vitro* quanto *in vivo*, os dois óleos mostraram ação inibitória sobre o crescimento dos quatro fungos avaliados (NABIGOL & MORSHEDI, 2011).

Lorenzetti et al. (2011) testaram 12 óleos essenciais contra *B. cinerea* isolado de morangueiro. Todos os óleos demonstraram certa atividade antifúngica, sendo que os óleos de capim-limão e de canela (*Cinnamomum zeilanicum*) foram os mais ativos.

Aminifard & Mohammadi (2012) utilizaram óleos essenciais de *Carum carvi* (cominho), *Foeniculum vulgare* (funcho) e *Mentha piperita* (menta) para o controle de *B. cinerea*, realizando testes *in vitro* e *in vivo* em ameixa, chegando à conclusão que os óleos essenciais das três plantas têm potencial antifúngico contra esta espécie.

Naruzawa & Papa (2011) testaram os extratos de 10 espécies de plantas do cerrado brasileiro contra *C. gloeosporioides* e *Corynespora cassiicola*, encontrando resultados diversos, desde a inibição até a promoção do crescimento dos fungos. Dentre as espécies que demonstraram efeito de controle, destacam-se *Myracrodruon urundeuva* (aroeira) e *Lafoensia pacari* (dedaleira). No estudo de Xu et al. (2007) foi utilizado o extrato de sementes de toranja (*Citrus paradisi*) para tentar inibir o desenvolvimento de *B. cinerea* em uvas de mesa, chegando-se a conclusão de que este extrato pode ser eficientemente utilizado no controle do mofo cinzento nessas frutas.

Bautista-Baños et al. (2003) testaram a planta *Pithecellobium dulce* e encontraram efeito inibidor sobre *B. cinerea*, *P. digitatum* e *R. stolonifer* em morango, nas formas de extrato aquoso e etanólico e também em pó.

Anaruma et al (2010) testaram óleos essenciais de 28 espécies de plantas medicinais contra *C. gloeosporioides* encontrando efeito inibitório para 15 plantas. Dentre estas, destacou-se *C. citratus*, que foi testado também *in vivo* em maracujá, demonstrando potencial de inibição do fungo.

Trabalho realizado por Reddy et al. (1998), aplicou óleos essenciais de duas cultivares de *Thymus vulgaris* (tomilho) em morango visando inibição de *B. cinerea* e *R.*

stolonifer. Os resultados mostraram inibição da ordem de 70% no desenvolvimento de ambos os fungos nas doses mais elevadas.

Tzortzakis (2007) testou óleos essenciais de eucalipto e canela sobre morangos e tomates, buscando controlar os fungos naturalmente presentes nas frutas, oriundos do campo, que as afetam na pós-colheita. Os resultados demonstraram diminuição da taxa de infecção dos produtos em diferentes concentrações.

Viuda-Martos et al. (2008), demonstraram haver atividade inibidora dos óleos essenciais de quatro espécies de citros sobre diversos fungos deterioradores de alimentos. As espécies *C. lemon*, *C. reticulata*, *C. paradisi* e *C. sinensis*, mostraram em testes *in vitro* inibir, parcial ou totalmente, o crescimento de *A. niger*, *A. flavus*, *Penicillium chrysogenum* e *P. verrucosum*.

3. OBJETIVOS

- Determinar *in vitro* a Concentração Mínima Inibitória – MIC de nove óleos essenciais de espécies de *Citrus* e de *Cymbopogon citratus*, sobre os fungos *C. gloeosporioides* e *B. cinerea*;
- Determinar a composição química dos óleos essenciais que demonstrarem menores valores de MIC para os fungos em questão;
- Avaliar o potencial de controle dos fitopatógenos pelos óleos essenciais de melhor atividade *in vivo*, sob duas condições experimentais, ou seja, simulando armazenamento sob condições ambiente e refrigerado;
- Avaliar os efeitos da aplicação dos óleos mais ativos, sobre algumas características físico-químicas dos morangos;
- Avaliar o potencial antifúngico dos óleos essenciais quando incorporados em filme comestível *in vitro*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Avaliação do potencial antifúngico de nove espécies de *Citrus* e de *Cymbopogon citratus*.

4.1.1 Fungos fitopatogênicos

Os micro-organismos utilizados foram os fungos *Colletotrichum gloeosporioides* CBMAI 0864 e *Botrytis cinerea* CCT 1252. A cepa CBMAI 0864 foi obtida a partir da Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria – CBMAI, do CPQBA/UNICAMP e a CCT 1252 junto à Coleção de Culturas Tropicais da Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”.

4.1.2 Meios de cultura para manutenção dos fungos

Batata Dextrose Ágar - BDA Oxoid (g/L): Infusão de batata, 4; D (+) glicose, 20; agar-agar, 15, água destilada para 1000 mL.

Ágar Aveia (g/L): aveia em flocos, 30; agar-agar, 15; água destilada para 1000 mL. A aveia dispersa em água foi fervida em fogo brando por 2 h e em seguida filtrada em gaze. Ao conteúdo foi adicionado e dissolvido o agar-agar.

Os meios de cultura foram esterilizados em autoclave a 121 °C e 1 atm por 15 min.

4.1.3 Manutenção dos fungos e obtenção dos esporos

A cepa de *C. gloeosporioides* foi repicada em meio BDA (Batata Dextrose Ágar) a fim de propiciar a produção de esporos, sendo incubada em estufa com temperatura controlada a 24 °C. Com a mesma finalidade, o *B. cinerea* foi repicado em meio Ágar-Aveia, sendo submetido a crescimento à temperatura ambiente com exposição à fotoperíodo, ou seja, alternando incubação em presença e ausência de luz a cada 12 h.

Para ambos os fungos, o período de incubação para a produção de esporos variou de 10 a 20 dias, sendo observadas as características morfológicas das colônias e também o preparo de lâminas para confirmar a presença de esporos em microscópio.

4.1.4 Obtenção e diluição dos óleos essenciais

Neste trabalho foram avaliados 10 óleos essenciais obtidos a partir de nove diferentes espécies de *Citrus* (*Rutacea*), e da espécie *Cymbopogon citratus* (*Poacea*). Todos foram adquiridos no comércio local, da marca Bioessência[®], sendo provenientes de extração por hidrodestilação ou expressão a frio, de acordo com metodologia e especificações próprias do fabricante. Os óleos utilizados estão relacionados na Tabela 4.

Antes dos ensaios, os óleos essenciais foram solubilizados em meio de cultura RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute medium*) contendo até 10 % de DMSO (dimetilsulfóxido) e Tween 20 a 0,5 %, para uma concentração final de 8 mg.mL⁻¹. A solução foi submetida à agitação em banho ultrassônico até total solubilização dos óleos.

Tabela 4. Óleos essenciais utilizados

Nome científico	Nome popular	Partes das plantas utilizadas	Método de Obtenção
<i>Citrus aurantium bergamia</i>	Bergamota	Fruto	Expressão a frio
<i>C. aurantium v. amara</i>	Laranja Azeda	Casca	Expressão a frio
<i>C. paradisi</i>	Toranja (“Grape Fruit”)	Casca	Expressão a frio
<i>C. reticulata</i>	Tangerina	Casca	Expressão a frio
<i>C. sinensis</i>	Laranja Doce Orgânica	Casca	Expressão a frio
<i>C. aurantium v. amara</i>	“Petit Grain”	Folhas e ramos	Hidrodestilação
<i>C. medica</i>	Cidra	Casca	Expressão a frio
<i>C. limon</i>	Limão Siciliano	Casca	Expressão a frio
<i>C. aurantium v. dulcis</i>	Laranja Doce	Casca	Expressão a frio
<i>Cymbopogon citratus</i>	Capim-limão	Folhas	Hidrodestilação

4.1.5 Atividade antifúngica dos óleos essenciais - Determinação da Concentração Mínima Inibitória.

A determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC) foi realizada conforme CLSI (2002), com o intuito de avaliar qual a concentração mínima de óleo essencial necessária para impedir o desenvolvimento dos fungos estudados.

4.1.5.1 Preparo da suspensão de esporos

A primeira etapa consistiu em preparar uma suspensão de esporos de cada fungo utilizado. Para tanto, adicionou-se 1,0 mL de solução salina 0,85 % sobre a placa contendo as colônias fúngicas obtidas conforme descrito no item 4.1.3, procedendo uma raspagem dos esporos utilizando alça de Drigalsky. Em caso de difícil dispersão dos esporos foram adicionadas gotas de Tween 20 a 0,5%. Em seguida, a solução contendo esporos foi filtrada em gaze, de modo a serem retidas hifas, pedaços de meio e demais impurezas macroscópicas. Repetiu-se a operação por três vezes.

A suspensão de esporos obtida foi padronizada para atender à concentração prevista no método (CLSI, 2002), no caso $1,0 \cdot 10^5$ UFC.mL⁻¹, determinada através de leitura em espectrofotômetro (UV-1240 Mini – Shimadzu) para uma absorbância entre 0,09 – 0,11 em 530 nm. Em seguida, essa suspensão foi diluída 1:50 no meio RPMI-1640.

4.1.5.2 Teste da microdiluição.

Em uma microplaca esterilizada de 96 compartimentos ou poços (com 12 colunas) foram depositados 100 µL de caldo RPMI-1640 em cada um destes. A primeira coluna da placa serviu como controle do processo. Nela foram acrescentados 150µL de caldo RPMI e 50µL do óleo essencial a ser analisado, de concentração conhecida. Na segunda coluna foram depositados 100 µL de cada óleo essencial, sendo o conteúdo do orifício homogeneizado com o meio e transferidos 100 µL para o orifício da coluna seguinte, repetindo-se este procedimento até a coluna 10 de modo a obter concentrações finais entre 2,0 e 0,0078 mg.mL⁻¹. Os 100 µL finais foram desprezados. A última coluna da placa (coluna 12) serviu como controle do micro-organismo e a penúltima como controle do meio

de cultura, portanto, não foram adicionadas de óleo essencial. Em seguida, 100µL da suspensão de esporos preparada conforme descrito no item 4.1.5.1 foram adicionados a cada poço. As placas foram seladas com parafilm M[®] e incubadas a 35 °C (*C. gloeosporioides*) ou 25 °C (*B. cinerea*), e observadas quanto ao crescimento após 72 h. A MIC foi definida como a menor concentração do óleo essencial capaz de inibir o crescimento do micro-organismo, visualmente detectado pela mudança de coloração do meio RPMI, de rosa (original) para amarelo (indicação de mudança de pH pelo crescimento microbiano).

Foi realizado também o teste com um controle positivo, o fungicida Cercobin[®] 700 WP (ingrediente ativo: tiofanato metílico 700 g.kg⁻¹), para ambos os fungos.

4.2 Determinação da composição química dos óleos essenciais por CG-EM – Cromatografia Gasosa acoplada a Detector Seletivo de Massas.

A identificação dos constituintes dos óleos essenciais que apresentaram os melhores resultados de atividade antimicrobiana foi realizada em cromatógrafo a gás Hewlett-Packard 6890, equipado com detector seletivo de massas Hewlett-Packard 5975, injetor *split/splitless*, utilizando-se uma coluna capilar HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). Temperaturas: injetor = 220 °C, detector = 250 °C, coluna = 60°C, 3°C.min⁻¹, 240 °C. Vazão do gás de arraste (He super seco) = 1,0 mL.min⁻¹. Os perfis identificados foram comparados com Adams (2007).

4.3 Emprego de óleos essenciais como agentes antifúngicos em pós-colheita de morangos.

Uma vez obtidos os valores de MIC para os óleos testados, selecionou-se os mais ativos para aplicação em pós-colheita de morangos. Os ensaios *in vivo* foram realizados em duas condições diferentes e não relacionadas. Na primeira, foi simulada condição de comercialização de morangos e, na segunda, condição de armazenamento. As características dos morangos, a preparação das soluções de esporos e o procedimento de inoculação foram, no entanto, idênticos para ambas.

4.3.1 Morangos

Foram utilizados morangos (*Fragaria x ananassa* Duch. cv. Oso Grande) obtidos através de fornecedor das Centrais de Abastecimento de Campinas S.A. (CEASA) - Campinas-SP. As frutas foram trazidas ao laboratório no máximo um dia após a colheita, com início imediato dos experimentos. Selecionou-se frutas de tamanho uniforme, com coloração avermelhada, porém não totalmente, isto é, que ainda apresentassem regiões claras esverdeadas.

4.3.2 Preparo de esporos dos fungos e inoculação dos pseudofrutos.

A suspensão de esporos dos fungos *B. cinerea* e *C. gloeosporioides* foi preparada de acordo com o descrito no item 4.1.5.1. Em seguida, cada fruta foi inoculada com uma alíquota de 7 μ L da suspensão padronizada de esporos, com auxílio de uma microsseringa de vidro, através de uma perfuração na epiderme da fruta. Uma vez decorrida a inoculação, observou-se uma pausa de 2 h de incubação. De acordo com o tratamento, as frutas foram inoculadas com um dos fungos utilizados ou não foram inoculadas, para que, neste caso, toda carga fúngica presente proviesse exclusivamente da microbiota naturalmente presente nas frutas.

4.3.3 Condições Ambiente de Armazenamento

Pautando-se no que seria um expositor em supermercado ou feira como exemplo, foram estipuladas condições similares para desenvolver o experimento. Assim, foi utilizada uma câmara do tipo Fitotron (Convicon[®]) do CPQBA/UNICAMP, com temperatura controlada em 25 ± 2 °C, o que seria próximo às condições ambientais na região de Campinas-SP. Foi aplicado também fotoperíodo (12 h com luz e 12 h sem luz), com o intuito de imitar condições a que estariam expostas as frutas no interior de um local de comercialização, a exemplo de um supermercado. Por fim, a umidade relativa do ar foi monitorada durante o decorrer do experimento com o auxílio de um termo-higrômetro (Minipa MT-241), estando compreendida em $50 \pm 5\%$.

4.3.3.1 Aplicação do óleo essencial

Os óleos essenciais foram aplicados em cada fruta de duas diferentes maneiras, por contato direto e por volatilização. Para os ensaios de contato direto foram utilizados 50 mL de uma solução de água destilada esterilizada contendo o óleo essencial e, como dispersante, 1,0 mL do espalhante adesivo HAITEN[®]. A solução de óleo essencial foi vertida em um Becker de tamanho suficiente para permitir a completa imersão do morango. No interior de uma câmara de fluxo laminar, as frutas foram imersas uma a uma na solução contendo óleo essencial durante 2 min, sendo em seguida acomodadas sobre papel alumínio durante 10 min, para secagem. Como controle, os morangos foram imersos em 50 mL de água destilada esterilizada, contendo 1,0 mL do espalhante adesivo.

As frutas tratadas com os óleos essenciais foram acomodadas em recipientes plásticos do tipo cuia, próprios para a comercialização de morangos. Estes foram selados com filme estirável de PVC, a fim de minimizar a perda de compostos voláteis presentes nos óleos essenciais, mas permitindo, no entanto, a troca gasosa e a respiração das frutas e evitando o processo de anaerobiose.

Um segundo tipo de aplicação consistiu em avaliar a ação exclusiva dos compostos voláteis do óleo essencial. Assim, no teste de simulação de comercialização, 10 mL do óleo diluído foram vertidos sobre um papel filtro de dimensões 10 x 5,0 cm alocado no fundo dos recipientes plásticos do tipo cuia, sendo estes selados com filme estirável de PVC, a fim de diminuir a perda dos compostos voláteis presentes, mas permitindo a entrada de oxigênio. Neste caso, a testemunha consistiu em aplicar no papel o mesmo volume de água destilada estéril com o espalhante adesivo.

4.3.3.2 Tratamentos

Foram selecionados os dois óleos essenciais que apresentaram melhor atividade no teste de microdiluição, contra ambos os fungos, ou seja, *C. sinensis* e *C. citratus*, totalizando 18 tratamentos, conforme Tabela 5. Cada tratamento consistiu em três repetições contendo seis morangos cada, totalizando dezoito morangos. Da mesma forma foi composto o grupo controle, onde não foi aplicado o óleo essencial. Foi estabelecida a

dosagem única de $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ para ambos os óleos em todos os tratamentos. A dosagem escolhida equivaleu à maior MIC observada dentre os dois óleos selecionados.

Tabela 5. Tratamentos com óleos essenciais empregados na pós-colheita de morangos. Ensaio de simulação de comercialização.

Tratamento	Óleo	Fungo	Método
1	<i>C. citratus</i>	<i>B. cinerea</i>	Contato
2	<i>C. citratus</i>	<i>B. cinerea</i>	Voláteis
3	<i>C. citratus</i>	<i>C. gloeosporioides</i>	Contato
4	<i>C. citratus</i>	<i>C. gloeosporioides</i>	Voláteis
5	<i>C. citratus</i>	Sem inóculo	Contato
6	<i>C. citratus</i>	Sem inóculo	Voláteis
7	<i>C. sinensis</i>	<i>B. cinerea</i>	Contato
8	<i>C. sinensis</i>	<i>B. cinerea</i>	Voláteis
9	<i>C. sinensis</i>	<i>C. gloeosporioides</i>	Contato
10	<i>C. sinensis</i>	<i>C. gloeosporioides</i>	Voláteis
11	<i>C. sinensis</i>	Sem inóculo	Contato
12	<i>C. sinensis</i>	Sem inóculo	Voláteis
13	Sem óleo	<i>B. cinerea</i>	Contato
14	Sem óleo	<i>B. cinerea</i>	Voláteis
15	Sem óleo	<i>C. gloeosporioides</i>	Contato
16	Sem óleo	<i>C. gloeosporioides</i>	Voláteis
17	Sem óleo	Sem inóculo	Contato
18	Sem óleo	Sem inóculo	Voláteis

4.3.4 Armazenamento Refrigerado

No intuito de simular condições de uma câmara de armazenamento ou ambiente climatizado foi utilizada uma câmara de germinação (Hannover[®]) com temperatura controlada a $10 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Neste caso, não foi aplicado fotoperíodo, permanecendo o interior da câmara sem luz durante todo o decorrer do experimento. O monitoramento da umidade

relativa foi realizado através de um termo-higrômetro (Minipa MT-241), estando compreendida em $55 \pm 5\%$.

4.3.4.1 Aplicação do óleo essencial

A aplicação do óleo essencial pelo método de contato direto se deu da mesma maneira do apresentado no item 4.3.3.1. No teste de armazenamento refrigerado, entretanto, as embalagens plásticas onde as frutas já tratadas foram acomodadas possuíam receptáculos individuais para cada morango, evitando o contato direto entre eles, e tampa plástica contendo orifícios para a troca gasosa.

No método de aplicação por ação dos voláteis, dois discos de espuma, com 3,0 cm de raio e 1,0 cm de altura foram embebidos na solução de óleo essencial por 2 min, e imediatamente posicionados em receptáculos localizados no centro das embalagens. Como controle, discos idênticos foram embebidos em água com 2% de espalhante adesivo, procedendo da mesma maneira.

4.3.4.2 Tratamentos

No teste sob armazenamento refrigerado foram utilizadas três repetições contendo 10 morangos cada, totalizando 24 tratamentos, com 30 frutas para cada tratamento, inclusive controle, conforme Tabela 6. O grupo controle foi composto da mesma maneira. Nesta modalidade, no entanto, optou-se também por empregar a mistura dos dois óleos essenciais, em proporções iguais, correspondendo a um terceiro tratamento. A dosagem escolhida foi de $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ para todos os tratamentos.

Tabela 6. Tratamentos com óleos essenciais empregados na pós-colheita de morangos. Ensaio em Armazenamento Refrigerado.

Tratamento	Óleo	Fungo	Método
1	<i>C. citratus</i>	<i>B. cinerea</i>	Contato
2	<i>C. citratus</i>	<i>B. cinerea</i>	Voláteis
3	<i>C. citratus</i>	<i>C. gloeosporioides</i>	Contato
4	<i>C. citratus</i>	<i>C. gloeosporioides</i>	Voláteis
5	<i>C. citratus</i>	Sem inóculo	Contato
6	<i>C. citratus</i>	Sem inóculo	Voláteis
7	<i>C. sinensis</i>	<i>B. cinerea</i>	Contato
8	<i>C. sinensis</i>	<i>B. cinerea</i>	Voláteis
9	<i>C. sinensis</i>	<i>C. gloeosporioides</i>	Contato
10	<i>C. sinensis</i>	<i>C. gloeosporioides</i>	Voláteis
11	<i>C. sinensis</i>	Sem inóculo	Contato
12	<i>C. sinensis</i>	Sem inóculo	Voláteis
13	Mistura	<i>B. cinerea</i>	Contato
14	Mistura	<i>B. cinerea</i>	Voláteis
15	Mistura	<i>C. gloeosporioides</i>	Contato
16	Mistura	<i>C. gloeosporioides</i>	Voláteis
17	Mistura	Sem inóculo	Contato
18	Mistura	Sem inóculo	Voláteis
19	Sem óleo	<i>B. cinerea</i>	Contato
20	Sem óleo	<i>B. cinerea</i>	Voláteis
21	Sem óleo	<i>C. gloeosporioides</i>	Contato
22	Sem óleo	<i>C. gloeosporioides</i>	Voláteis
23	Sem óleo	Sem inóculo	Contato
24	Sem óleo	Sem inóculo	Voláteis

4.3.5 Avaliação da infecção fúngica.

Após os tratamentos descritos nos itens 4.3.3.1. e 4.3.4.1., as frutas ficaram incubadas por oito (Condições Ambiente de Armazenamento) ou 10 dias (Armazenamento Refrigerado) e a incidência de desenvolvimento fúngico foi avaliada a cada dois dias. A

avaliação consistiu na observação do número de morangos infectados visivelmente pelos fungos e qual a severidade da infecção, obedecendo-se a seguinte escala: 0- sem presença visível do fungo; 1- até 25% da superfície colonizada pelo fungo; 2- de 26-50%; 3- de 51-75%; e 4- acima de 75% da superfície (TZORTZAKIS, 2007). A partir destas informações calculou-se o Índice de Doença (adaptado de ANARUMA et al., 2010), através da seguinte equação:

$$\text{I.D. (\%)} = \{(1.n_1)+(2.n_2)+(3.n_3)+(4.n_4).(R.4)^{-1}\}.100$$

Onde: I.D.(%) = índice de doença (%); n1...4 = número de frutas com o respectivo escore de infecção; R = número total de frutas por tratamento

Tal método de avaliação foi escolhido por contemplar tanto os parâmetros quantitativos (número de frutas infectadas) quanto qualitativos (grau de infecção). Os resultados estão expressos em forma de porcentagem e o Índice de Doença dos tratamentos foi comparado ao do grupo controle.

4.3.6 Análise Estatística

Para as duas condições de ensaio consideradas foi utilizado o mesmo tratamento estatístico dos dados.

Considerando cada fungo separadamente, foi realizada a análise de variância das médias para cada dia avaliado, através de um delineamento fatorial. Como fatores, ficaram definidos os métodos de aplicação e os óleos essenciais (ou a mistura) utilizados.

A partir da análise de variância aplicou-se o teste t de Student ($p < 0,05$) para demonstrar se havia diferença entre os métodos de aplicação dos óleos. O teste de comparação com controle de Dunnett foi aplicado para mostrar quais óleos essenciais utilizados diferiam significativamente ($p < 0,05$) da testemunha.

Para normalização dos dados, estes foram transformados através da expressão $\sqrt{x + 0,5}$. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software Statistix®.

4.3.7 Análises físico-químicas

Dentre todos os tratamentos aplicados nos testes pós-colheita, o que demonstrou melhores resultados foi escolhido para a avaliação dos parâmetros físico-químicos iniciais das frutas e as alterações no decorrer do tempo do experimento. Para tanto, as condições do teste foram repetidas para avaliação das características de interesse. Para cada dia de medição, foram liquefeitos em homogeneizador do tipo Ultra-Turrax, cinco morangos por cada tratamento.

4.3.7.1 Absorbância da polpa

A absorbância da polpa liquefeita foi mensurada utilizando-se espectrofotômetro (UV Mini 1240 - Shimadzu), sob comprimento de onda de 540 nm.

4.3.7.2 Sólidos solúveis

O teor de sólidos solúveis foi avaliado utilizando-se um refratômetro manual (National - 15635).

4.3.7.3 Acidez titulável e pH

O pH do suco das frutas foi mensurado usando pH-metro (Hanna Instruments – modelo HI 2223). A acidez titulável foi estabelecida através de titulação com NaOH 0,01N e determinada pela fórmula:

$$(\text{g ácido cítrico}/100\text{g de suco}) = (V_{\text{NaOH}} \cdot N_{\text{NaOH}} \cdot 64.1,00) / (m_{\text{amostra}} \cdot 10)$$

Onde: V_{NaOH} = volume gasto de NaOH na titulação (mL); N_{NaOH} = Normalidade da solução de NaOH; m_{amostra} = massa da amostra (g).

Os resultados foram expressos em gramas de ácido cítrico/100g de suco.

4.3.7.4 Perda de massa

As alterações na massa das frutas foram também avaliadas através da pesagem de cinco morangos pré-identificados, por tratamento, nos diferentes dias de avaliação.

Todos os testes físico-químicos foram realizados nas condições iniciais das frutas e nos dias 3, 6 e 10 sob as condições de aplicação do tratamento.

4.4 Emprego dos óleos essenciais em revestimentos comestíveis para controle de *B. cinerea*.

Esta etapa do trabalho foi desenvolvida no Instituto de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo – localizado na Ciudad Politécnica de la Innovación, da Universidad Politécnica de Valencia, na Espanha.

4.4.1 Manutenção do fungo e obtenção de esporos

Foi utilizado para este ensaio o fungo *B. cinerea* – CECT 20516, proveniente da Coleção Espanhola de Cultivos Tipo. O micro-organismo foi inoculado em meio de cultura Batata Dextrose Ágar e incubado a 25 °C, até esporulação. Após esse período, foi preparada solução de esporos na concentração $1,0 \cdot 10^5$, utilizando-se uma câmara de Neubauer para contagem de células. De acordo com Sanchez-Gonzales et al. (2010), a concentração de esporos utilizada é adequada para avaliação de fungos em tratamentos pós-colheita.

4.4.2 Preparação do filme-revestimento.

Os filmes-revestimentos foram produzidos a partir da metodologia utilizada por Perdonés et al. (2012). Para a obtenção dos filmes utilizou-se uma base de metil-celulose a 1%. Nela foram dispersos os óleos essenciais nas concentrações abaixo indicadas.

Inicialmente foram preparadas as dispersões para formação do filme (*Film Forming Dispersion* – FFD). Para tanto, 33 g de água destilada foram primeiramente aquecidos em

chapa aquecedora magnética com agitação contínua. Após aquecimento, foi adicionado 1 g de metil-celulose em pó e, logo após, 65 g de água destilada. Ao atingir a temperatura de 80 °C, a solução foi retirada da chapa com aquecimento e transferida para um banho de gelo posicionado sobre outra chapa magnética com agitação contínua, mas sem aquecimento. A temperatura da dispersão foi monitorada de forma a mantê-la por 20 min a 5 °C. Após o banho de gelo, a solução foi acrescida do óleo essencial nas concentrações de 0,75; 1,5 e 3,0 mg.mL⁻¹ e a massa final da solução ajustada à 100g. Procedeu-se então à emulsificação da mistura, primeiramente em homogeneizador Ultra-Turrax Digital T25 IKA[®] a 13400 rpm por 4 min, e em seguida em sonicador, durante três séries de 1 min, com amplitude de 40 %, a 20 °C.

A partir das FFD, os filmes-revestimentos foram obtidos por moldagem. Das dispersões obtidas foram vertidos 15 g sobre placas de politetrafluoretileno (PTFE), de 5 cm de diâmetro. As placas, dispostas sobre superfícies niveladas, foram mantidas à temperatura ambiente sem qualquer interferência mecânica pelo período de 48 h a 72 h, até a total evaporação da água presente no FFD e a formação do filme. O filme foi retirado da placa de moldagem com auxílio de uma espátula e pré-condicionado em dessecador a 5 °C e 58 % de umidade relativa. Sua espessura foi então medida utilizando-se micrômetro portátil digital Palmer-Comecta[®].

Para composição das testemunhas, a concepção do filme deu-se da mesma maneira, porém sem a adição de óleo essencial.

4.4.3 Dosagem dos óleos essenciais

Os óleos essenciais e as dosagens utilizadas na composição dos revestimentos foram baseados nos valores de MIC obtidos a partir dos testes de microdiluição para *B. cinerea* descritos no item 4.1.5. Assim sendo, optou-se por utilizar os óleos essenciais em três diferentes dosagens: 0,75; 1,50 e 3,0 mg.mL⁻¹, visando abarcar uma faixa ampla de valores de MIC.

4.4.4 Determinação da efetividade antimicrobiana dos revestimentos.

A metodologia utilizada foi adaptada de Kristo et al. (2008).

Foram utilizadas placas de Petri plásticas de 5 cm de diâmetro. Em cada placa foram vertidos 10 g de meio BDA. Após a solidificação do meio, 10 µL de solução de esporos foram inoculados na superfície com auxílio de alça de Drigalsky. Os diferentes revestimentos, com exatamente o mesmo diâmetro da placa, foram dispostos sobre a superfície inoculada, de acordo com o tratamento. As placas foram então seladas com Parafilm® e incubadas em estufa a 25 °C por 7 dias. Foi realizada a contagem total de bolores no dia da inoculação (dia zero) e nos dias 3, 5 e 7. Para tanto, o conteúdo da placa foi diluído 1:10 e homogeneizado em água peptonada 2 %, com o auxílio de equipamento homogeneizador do tipo Stomacher®. Procedeu-se a partir daí uma diluição seriada e o plaqueamento em superfície de 100 µL em placas de BDA para enumeração de UFC.mL⁻¹. As placas foram mantidas a 25 °C e a contagem realizada após 72h de incubação.

4.4.5 Delineamento experimental

Cada óleo essencial em cada dosagem constituiu um tratamento. Foram realizadas duas repetições para cada tratamento em cada dia de avaliação. Da mesma maneira se organizou a testemunha.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais contra os fungos deterioradores pós-colheita de morango

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais listados na Tabela 4 foi avaliada frente aos fungos *B. cinerea* e *C. gloeosporioides*. Os resultados de Concentração Mínima Inibitória – MIC obtidos estão apresentados na Tabela 7, e representam a menor concentração de óleo essencial necessária para causar a inibição do crescimento dos fungos, dentro das condições estudadas.

A Tabela 7 mostra que o fungo *B. cinerea* foi mais susceptível à ação dos óleos essenciais do que *C. gloeosporioides*. Os óleos essenciais apresentaram ainda amplo espectro de ação sobre o *B. cinerea*. Neste caso, melhores atividades inibitórias foram observadas para os óleos de *C. sinensis* e *C. citratus*, com valores de MIC de 0,15 mg.mL⁻¹ e 0,06 mg.mL⁻¹, respectivamente.

Por outro lado, somente o óleo de *C. citratus* apresentou elevada atividade inibitória contra *C. gloeosporioides*, de 0,25 mg.mL⁻¹. Os demais óleos essenciais estudados ou apresentaram baixa inibição, entre 1,0 e 2,0 mg.mL⁻¹, ou esta não foi detectada (MIC >2,0 mg.mL⁻¹).

Em relação ao antifúngico controle utilizado, o Cercobin[®]700 WP mostrou atividade similar ou menor do que os óleos essenciais estudados.

Assim, de acordo com os resultados de atividade antifúngica obtidos foram selecionados os óleos essenciais de *C. citratus* e *C. sinensis* para os estudos posteriores, por haverem apresentado melhor potencial inibitório contra ambos os fungos.

O potencial antimicrobiano de *C. citratus* e de *C. sinensis* foi também demonstrado em outros trabalhos, sobre uma ampla gama de micro-organismos. Ohno et al. (2003) demonstraram ação do óleo essencial de *C. citratus* sobre a bactéria *Helicobacter pilory*, causadora de enfermidades gástricas em humanos, em condições similares às do estômago humano (*in vitro*) e em estômago de ratos (*in vivo*). O trabalho também indicou não haver a aquisição de resistência bacteriana à ação do óleo essencial.

Tabela 7. Atividade antimicrobiana (MIC – mg.mL⁻¹) dos óleos essenciais contra fungos deterioradores de morango.

Espécie	Nome Popular	<i>B. cinerea</i>	<i>C. gloeosporioides</i>
Vegetal			
<i>Citrus aurantium v. bergamia</i>	Bergamota	0,25	>2,0
<i>Citrus aurantium v. amara</i>	Laranja Azeda	0,25	2,0
<i>Citrus paradisi</i>	Grape Fruit	0,20	>2,0
<i>Citrus reticulata</i>	Tangerina	2,0	>2,0
<i>Citrus sinensis</i>	Laranja Doce	0,15	1,0
<i>Citrus aurantium v. amara</i>	Petit Grain	0,50	2,0
<i>Citrus medica</i>	Cidra	1,0	>2,0
<i>Citrus limon</i>	Limão	1,0	>2,0
<i>C. aurantium v. dulcis</i>	Laranja doce	0,25	2,0
<i>Cymbopogon citratus</i>	Capim-limão	0,06	0,25
Controle químico	Cercobin [®] 700WP	0,50	>2,0

Anaruma et al. (2010) também encontraram, utilizando a mesma metodologia *in vitro* utilizada no presente trabalho, elevada ação inibitória do crescimento de *C. gloeosporioides* por *C. citratus*, estando igualmente compreendida em 0,25 mg.mL⁻¹.

Hammer et al. (1999), encontraram forte ação inibitória *in vitro* por parte de *C. citratus* contra nove bactérias e uma levedura potencialmente patogênicas em alimentos. Os valores de MIC encontrados variaram de 0,03 a 0,25 mg.mL⁻¹, conforme a espécie alvo. O *C. citratus* mostrou-se o mais ativo entre 52 diferentes óleos essenciais de plantas testados.

Wilson et al. (1997) encontraram atividade de inibição da germinação de esporos de *B. cinerea* por *C. citratus*, a partir da concentração de 60 mg.mL⁻¹.

O óleo essencial de *C. sinensis* foi, de acordo com Stashenko et al (1996), responsável pela inibição *in vitro* de *Aspergillus niger*, exibindo potencial fungistático a partir de 1,5 µg.mL⁻¹ e mantendo uma inibição de 79 % do crescimento fúngico até o sétimo dia de experimento. De acordo com Viuda-Martos et al (2008), *C. sinensis* demonstrou inibir *in vitro* o crescimento de quatro espécies fúngicas deterioradoras de

alimentos. A maior ação inibitória foi registrada sobre *A. niger*, mantida até o sétimo dia de avaliação.

Os mecanismos de ação através dos quais os óleos essenciais causam a inibição da proliferação microbiana ou mesmo a lise celular não são ainda completamente compreendidos, sendo poucos os trabalhos que se dedicaram a estudar estes mecanismos em fungos filamentosos. No entanto, como apontam Duarte et al. (2012a), a ação dos óleos essenciais pode se dar através de alterações na integridade, composição e permeabilidade da membrana celular, estresse oxidativo, inibição de processos intracelulares de transporte de íons, ou mesmo a ruptura da membrana da célula.

5.2 Caracterização química dos óleos essenciais selecionados.

Os compostos presentes nos óleos essenciais de *C. citratus* e *C. sinensis* foram identificados quimicamente por CG-EM. Os resultados da composição química (% relativa) estão apresentados na Tabela 8. De acordo com o perfil observado, o óleo essencial de *C. citratus* apresentou os isômeros neral e geranial como componentes majoritários, perfazendo 2/3 da composição total. O óleo essencial de *C. sinensis* apresentou como composto majoritário o limoneno, que representou mais de 87 % da composição total.

Os compostos majoritários encontrados nos óleos essenciais foram alvo de teste quanto ao seu potencial antimicrobiano por outros autores. Caccioni et al (1998) encontraram efeito inibitório de espécies de *Citrus* sobre fungos do gênero *Penicillium*, demonstrando efeito de inibição por parte de alguns deles. As análises de CG e CG/MS demonstraram quantidades significativas de limoneno na composição dos óleos de melhor eficácia.

Vu et al. (2011) não observaram efeito antifúngico do limoneno em teste *in vitro* para controle da microflora total isolada de morangos. No entanto, o limoneno mostrou-se eficaz para aumentar a vida de prateleira de morangos, quando incorporado a uma matriz de quitosana modificada. Wilson et al. (1997), testaram diversas plantas quanto ao potencial inibitório de *B. cinerea* e observaram que algumas das que apresentaram potencial de inibição possuíam limoneno em sua composição.

Tabela 8- Perfil Cromatográfico e % relativa dos compostos presentes nos óleos essenciais.

Índice de Retenção	Nome do composto	<i>C. citratus</i> (% relativa)	<i>C. sinensis</i> (% relativa)
933	alfa-pineno	-	0,90
973	Sabineno	-	1,26
989	6-metil-5-hepten-2-ona	4,05	-
990	beta-pineno	-	2,50
991	beta-mirceno	1,43	-
993	dihidro-1,8-cineol	0,27	-
1004	Octanal	-	0,54
1026	Limoneno	0,27	87,90
1036	cis-ocimeno	1,71	-
1102	Linalol	4,97	0,98
1122	M=152	-	0,24
1134	óxido de cis-limoneno	-	1,16
1136	M=152	-	0,24
1138	óxido de trans-limoneno	-	0,68
1152	Citronelal	0,42	-
1164	M=152	0,47	-
1180	M=152	0,39	-
1182	M=152	0,93	-
1220	trans-carveol	-	0,34
1231	M=152	-	0,41
1234	Citronelol	0,64	-
1245	Carvona	-	0,33
1249	Neral	30,00	-
1258	M=152	1,46	-
1263	Geraniol	4,58	-
1281	Geranial	36,03	-
1285	M=152	0,24	-
1295	2-undecanona	0,26	-
1364	M=164	-	0,62
1379	M=150	-	0,40
1386	acetato de geranila	3,43	-
1390	beta-elemeno	0,28	-
1419	trans-cariofileno	4,17	-
1434	alfa-trans-bergamoteno	1,07	-
1451	alfa-humuleno	0,57	-
1455	beta-trans-farneseno	0,20	-
1495	2-tridecanona	0,17	-
1582	óxido de cariofileno	0,73	-
1602	M=222	0,22	-

Chutia et al (2009), obtiveram bons resultados de inibição do crescimento de *A. alternata*, *R. solani* e *Curvularia lunata*, utilizando óleo essencial de *C. reticulata* (MIC 0,2

mL.100 mL⁻¹). A caracterização química do óleo demonstrou também ser composto majoritariamente por limoneno (46,7%), geranial (19,0%) e neral (14,5%).

Brand (2012) demonstrou que a exposição ao limoneno causou efeito inibitório do crescimento e germinação de esporos de espécies de *Colletotrichum* isoladas de plantas de citros.

O citral (mistura dos isômeros neral e geranial presente nos óleos essenciais) foi responsável pela inibição do crescimento micelial de *Fusarium oxysporum cubense*, *C.gloeosporioides*, *Bipolaris* sp. e *Alternaria alternata*, a partir da concentração de 58,24 µg.mL⁻¹ (GUIMARÃES et al., 2011).

5.3 Emprego de óleos essenciais como agentes antifúngicos em pós-colheita de morangos.

5.3.1 Teste sob Condições Ambiente de Armazenamento.

No teste que visou simular condições de comercialização de morangos, foi mensurado o Índice de Doença (ID %) para cada óleo essencial, na dosagem única de 1,0 mg.mL⁻¹, sobre morangos em três diferentes condições de inoculação: sem inoculação, com inoculação de *B. cinerea* e com inoculação de *C. gloeosporioides*. A Tabela 9 mostra os resultados médios obtidos para os dois óleos essenciais e o grupo controle, sobre morangos não inoculados com fungos, assim como as probabilidades estatísticas obtidas a partir do teste fatorial.

O teste estatístico de Dunnett para comparação com controle demonstrou que houve efeito de inibição do desenvolvimento fúngico nos dias 2 e 4, ou seja, no período inicial. A partir do sexto dia de acompanhamento, os óleos essenciais passaram a não exercer qualquer efeito inibitório.

O teste t de Student mostrou, por outro lado, uma vantagem clara do método de aplicação por contato direto sobre o método de ação exclusiva dos compostos voláteis durante todo o decorrer do ensaio.

Tabela 9 – Índice de Doença (%) observado durante tratamento com óleos essenciais em pós-colheita de morangos (não inoculados com fungos). Simulação das condições de comercialização.

	Dias			
	2	4	6	8
	Efeito do óleo essencial			
<i>C. citratus</i>	5,556*	39,584*	77,084	85,417
<i>C. sinensis</i>	6,945*	35,417*	59,723	72,917
Controle (sem óleo)	15,972	56,945	62,501	75,001
	Efeito da aplicação			
Voláteis	12,963 ^a	55,556 ^a	75,927 ^a	84,723 ^a
Contato	6,019 ^b	32,408 ^b	56,945 ^b	70,834 ^b
CV (%)	26,9	11,0	7,8	6,4

Números seguidos de (*) indicam valores estatisticamente diferentes do grupo controle, de acordo com o teste de Dunnett para $p < 0,05$.

Letras diferentes indicam valores diferentes segundo o teste t de Student para $p < 0,05$.

A Figura 1 mostra a evolução do desenvolvimento fúngico durante o período de incubação e a Figura 2 mostra a diferença observada entre os dois métodos de aplicação.

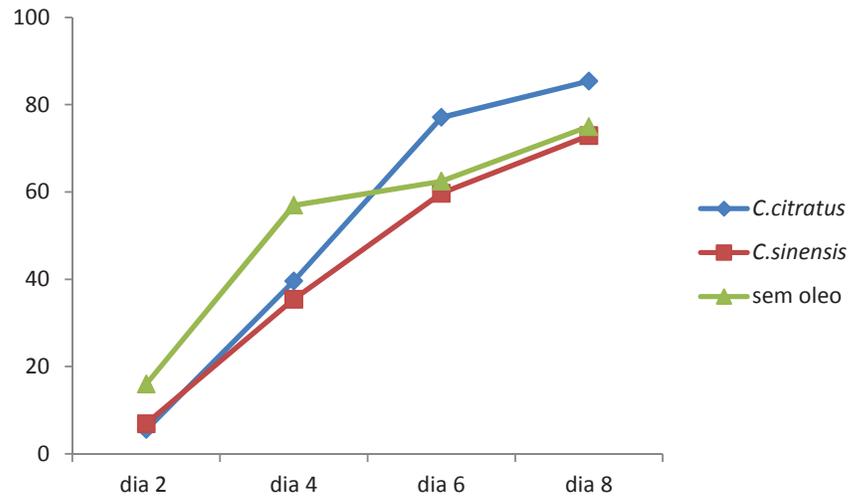


Figura 1 – Evolução do Índice de Doença (ID %) observado no decorrer de 8 dias de incubação para morangos sem inoculação de fungos.

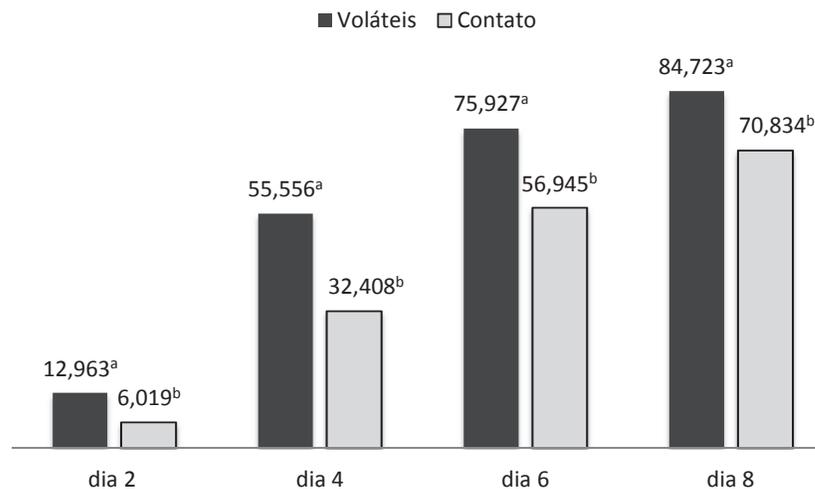


Figura 2 – Comparação do desempenho dos diferentes métodos de aplicação dos óleos essenciais, de acordo com o Índice de Doença (%) observado em morangos sem inoculação de fungos. Letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes segundo o teste t de Student para $p < 0,05$.

No que diz respeito aos morangos inoculados com o fungo *C. gloeosporioides*, pode-se notar uma inibição expressiva no crescimento fúngico no período inicial do experimento (até o dia 4) apenas para o óleo essencial de *C. sinensis*. No entanto, mais uma vez, tal potencial de inibição não se sustentou no período final, deixando de mostrar qualquer diferença estatística em relação ao grupo controle a partir do dia 6.

Quanto ao modo de aplicação, o tratamento por contato direto manteve-se significativamente mais efetivo em todo o decorrer do experimento. A Tabela 10 e a Figura 3 mostram a evolução do ID % para os morangos inoculados com *C. gloeosporioides*, de acordo com cada óleo essencial utilizado.

Tabela 10 - Índice de Doença (%) apresentado por morangos inoculados com *C. gloeosporioides*, submetidos a tratamento com óleos essenciais.

	Dias			
	2	4	6	8
	Efeito do óleo essencial			
<i>C. citratus</i>	15,278	50,000	72,223	76,390
<i>C. sinensis</i>	6,945*	31,945*	60,417	70,834
Controle (sem óleo)	16,667	55,556	72,223	80,556
	Efeito da aplicação			
Voláteis	17,593 ^a	58,797 ^a	79,167 ^a	85,186 ^a
Contato	8,333 ^b	32,871 ^b	57,408 ^b	66,667 ^b
CV (%)	24,1	17,5	13,3	9,4

Números seguidos de (*) indicam valores estatisticamente diferentes do grupo controle, de acordo com o teste de Dunnett para $p < 0,05$. Letras diferentes indicam valores diferentes segundo o teste t de Student para $p < 0,05$.

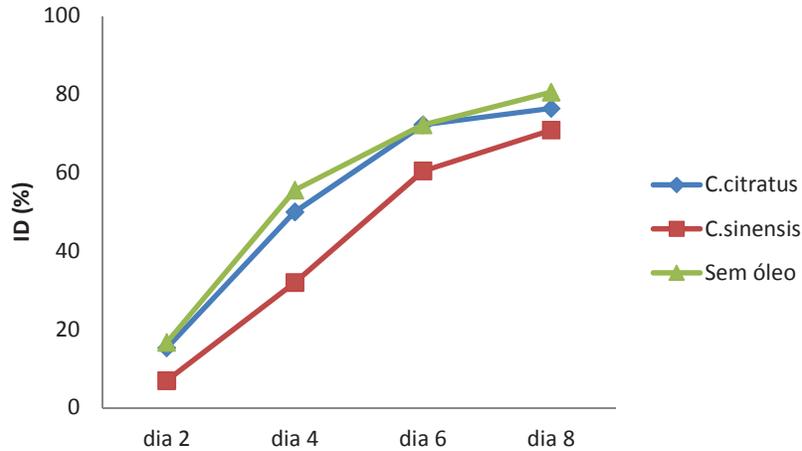


Figura 3 – Evolução do Índice de Doença (%) de morangos inoculados com *C. gloeosporioides*, de acordo com os diferentes óleos no decorrer do período de incubação.

A Figura 4 apresenta os valores de ID %, de acordo com o método de aplicação.

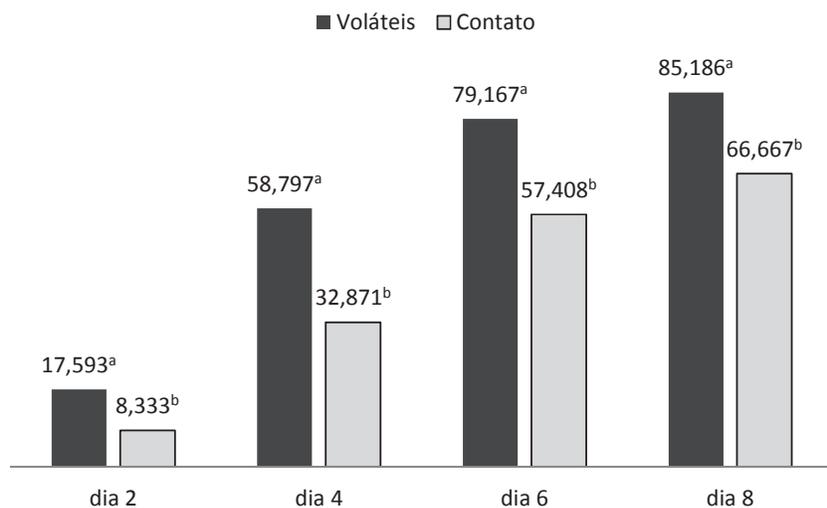


Figura 4 – Índice de Doença (%) apresentado pelos diferentes métodos de aplicação no decorrer do experimento. Letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes segundo o teste t de Student para $p < 0,05$.

Nos morangos inoculados com *B. cinerea* não foi possível observar qualquer diferença estatística entre os tratamentos com os diferentes óleos, de acordo com o teste de comparação com controle de Dunnett ($p < 0,05$) (Tabela 11; Figura 5). Tampouco observou-se qualquer diferença entre os métodos de aplicação, de acordo com o teste t de Student ($p < 0,05$) (Figura 6).

Tabela 11 - Índice de Doença (%) apresentado por morangos inoculados com *B. cinerea*, submetidos a tratamento com óleos essenciais.

	Dias			
	2	4	6	8
	Efeito do óleo essencial			
<i>C. citratus</i>	17,361	79,862	94,445	97,917
<i>C. sinensis</i>	28,472	78,473	95,140	97,917
Controle (sem óleo)	40,278	88,195	95,140	97,917
	Efeito da aplicação			
Voláteis	36,574	84,723	94,445	97,223
Contato	20,833	79,630	95,371	98,612
CV (%)	36,0	9,2	3,0	2,3

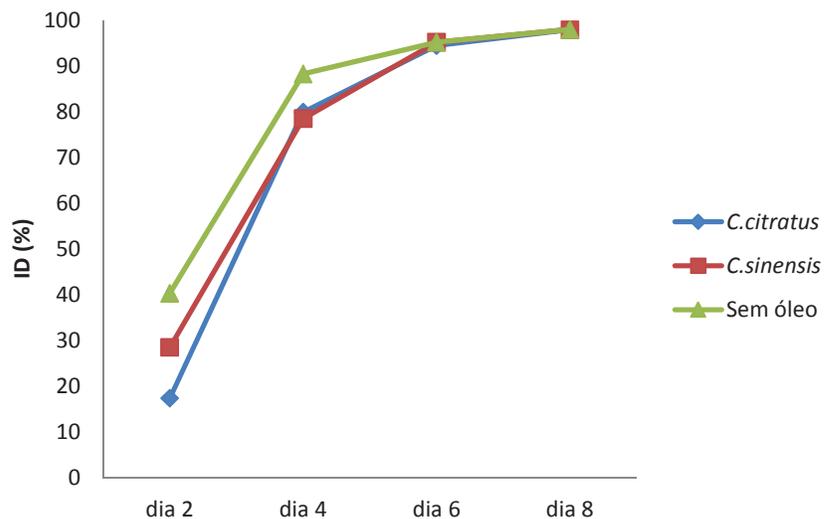


Figura 5 – Evolução do Índice de Doença (%) de morangos inoculados com *B.cinerea*, de acordo com os diferentes óleos no decorrer do período de incubação.

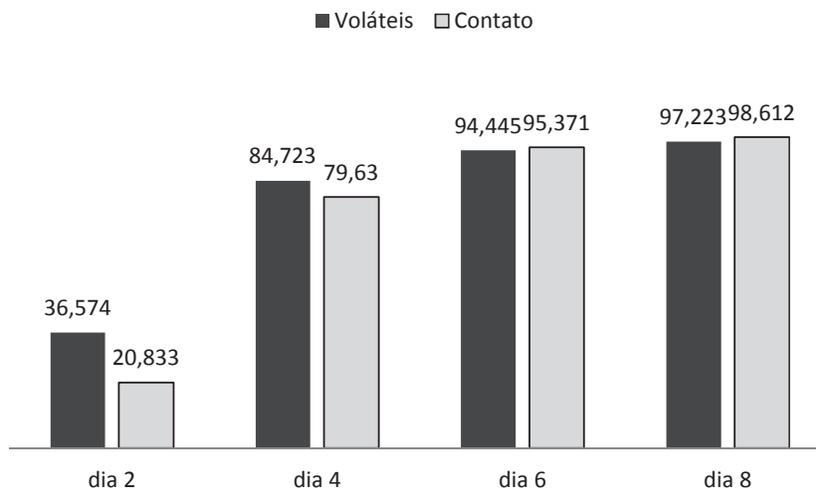


Figura 6 - Comparação do desempenho dos diferentes métodos de aplicação dos óleos essenciais, de acordo com o Índice de Doença (%) observado em morangos com inoculação do fungo *B. cinerea*.

5.3.2 Teste sob Armazenamento Refrigerado.

No teste de simulação de condições de armazenamento foram avaliados os Índices de Doença relativos à aplicação dos óleos essenciais de *C. citratus*, *C. sinensis*, da mistura dos dois óleos em partes iguais, e também mantido um grupo controle sobre morangos em três condições de inoculação: sem inoculação; inoculados com *C. gloeosporioides*; e inoculados com *B. cinerea*.

Os valores obtidos para a aplicação dos óleos essenciais sobre os morangos sem inoculação estão apresentados na Tabela 12. Neste ensaio, nenhum óleo essencial demonstrou potencial de inibição do crescimento fúngico em comparação com o grupo controle, como ilustra a Figura 7. Quanto ao método de aplicação, a diferença esteve presente apenas na primeira medição, estando ausente a partir do dia 4, como mostra a Figura 8.

Tabela 12 – Índice de Doença (%) observado em morangos sem inoculação, para os diferentes tratamentos com óleos essenciais, no decorrer do experimento.

	Dias				
	2	4	6	8	10
	Efeito do óleo essencial				
<i>C. citratus</i>	1,250	1,250	20,000	39,167	58,333
<i>C. sinensis</i>	0,833	0,833	22,083	44,583	58,750
Mistura	1,667	1,667	12,500	31,250	52,917
Sem óleo (controle)	2,500	2,500	13,750	24,583	48,333
	Efeito da aplicação				
Voláteis	2,500 ^a	6,458	18,333	37,083	58,542
Contato	0,625 ^b	3,958	15,830	32,708	50,625
CV %	33,1	28,2	25,4	15,9	14,8

Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes para $p < 0,05$

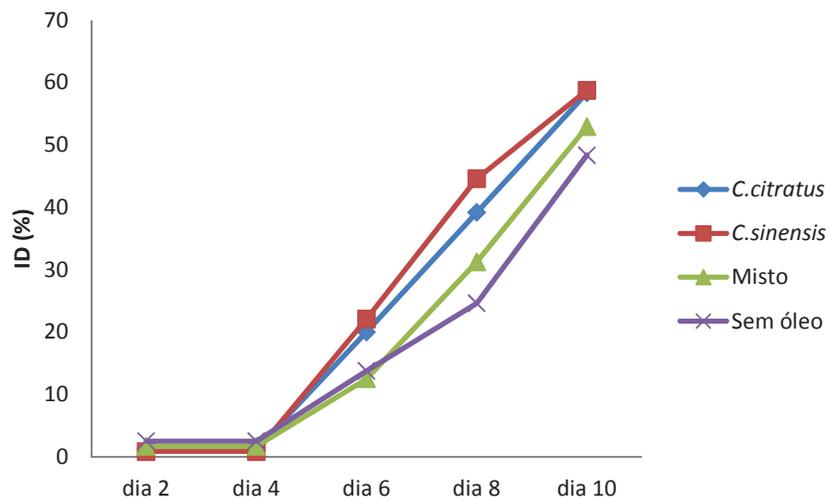


Figura 7 – Evolução do Índice de Doença (%) em morangos sem inoculação de fungos, para os diferentes tratamentos com óleos essenciais no decorrer do experimento.

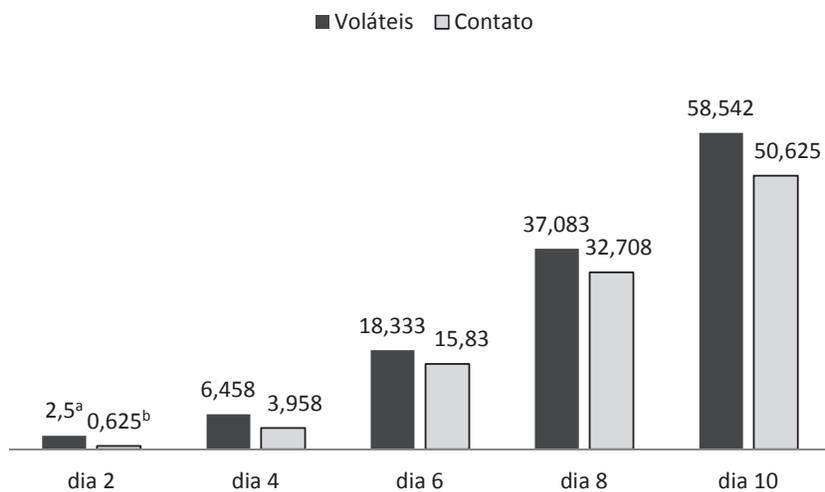


Figura 8 - Comparação do desempenho dos diferentes métodos de aplicação dos óleos essenciais, de acordo com o Índice de Doença (%) observado em morangos sem inoculação de fungos. Letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes segundo o teste t de Student para $p < 0,05$.

Nos morangos inoculados com *C. gloeosporioides* foi possível identificar um prolongamento da vida pós-colheita das frutas, pela aplicação da mistura em partes iguais dos óleos essenciais, uma vez que o potencial de inibição se mostrou no final do período de medições, sendo diferente do grupo controle do dia 8 ao dia 10. No que diz respeito aos métodos de aplicação, a diferença de efetividade pôde ser observada a partir do dia 6, perdurando até o dia 10. O modo de aplicação por contato direto mostrou também ser o mais eficaz (Tabela 13; Figura 9; Figura 10).

Tabela 13 – Índice de Doença (%) observado para os diferentes óleos essenciais e mistura utilizados no decorrer do experimento em morangos inoculados com *C. gloeosporioides*.

	Dias				
	2	4	6	8	10
	Efeito do óleo essencial				
<i>C. citratus</i>	1,667	2,917	14,167	36,250	52,500
<i>C. sinensis</i>	0,417	4,167	11,250	33,750	52,083
Mistura	1,667	4,583	7,917	22,500*	35,833*
Sem óleo (controle)	1,667	6,250	15,417	38,750	51,667
	Efeito da aplicação				
Voláteis	1,250	4,792	16,667 ^a	43,125 ^a	60,625 ^a
Contato	1,458	4,167	7,708 ^b	22,500 ^b	35,417 ^b
CV %	35,4	42,6	30,7	15,4	12,6

Números seguidos de (*) indicam valores estatisticamente diferentes do grupo controle, de acordo com o teste de Dunnett para $p < 0,05$. Letras diferentes indicam valores diferentes segundo o teste t de Student para $p < 0,05$.

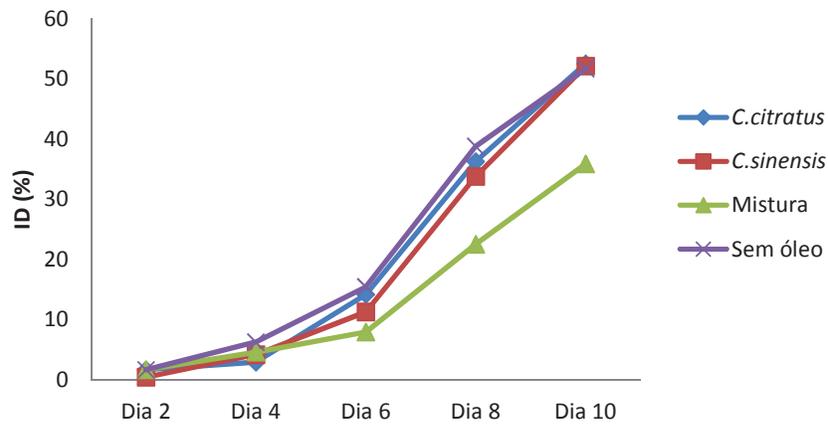


Figura 9 - Evolução do Índice de Doença (ID %) de acordo com os diferentes óleos essenciais ou mistura aplicados, em morangos inoculados com *C. gloeosporioides*.

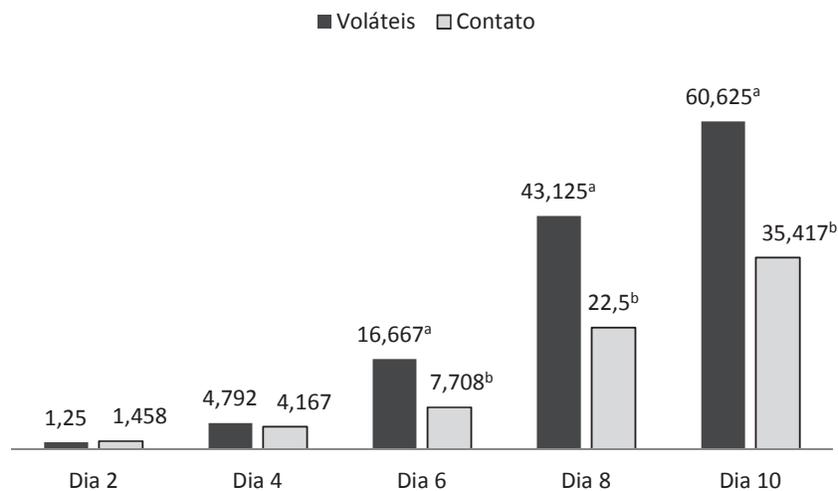


Figura 10 - Comparação do desempenho dos diferentes métodos de aplicação dos óleos essenciais, de acordo com o Índice de Doença (%) observado em morangos com inoculação de *C. gloeosporioides*. Letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes segundo o teste t de Student para $p < 0,05$.

No que diz respeito aos morangos inoculados com *B. cinerea* não houve qualquer inibição do crescimento fúngico por parte dos óleos essenciais. A Tabela 14 mostra os resultados de Índice de Doença obtidos e a Figura 11 a evolução do desenvolvimento fúngico no decorrer do experimento. Nessas condições, os morangos submetidos ao

tratamento de exposição aos compostos voláteis demonstraram menor desenvolvimento fúngico, contrapondo-se à tendência observada nos demais casos. Essa diferença é mostrada na Figura 12.

Tabela 14 - Índice de Doença (%) observado para os diferentes óleos essenciais e mistura utilizados no decorrer do experimento em morangos inoculados com *B. cinerea*.

	Dias				
	2	4	6	8	10
	Efeito do óleo essencial				
<i>C. citratus</i>	1,667	5,000	11,667	19,583	43,333
<i>C. sinensis</i>	1,667	6,250	11,250	22,083	45,417
Mistura	1,250	6,667	12,500	23,750	53,750*
Sem óleo (controle)	1,250	7,500	11,667	20,000	33,750
	Efeito da aplicação				
Voláteis	1,250	2,708 ^b	6,042 ^b	9,792 ^b	42,083
Contato	1,667	10,000 ^a	17,500 ^a	32,917 ^a	46,042
CV %	45,3	28,8	22,4	19,500	13,3

Números procedidos de (*) indicam valores estatisticamente diferentes do grupo controle, de acordo com o teste de Dunnett para $p < 0,05$. Letras diferentes indicam valores diferentes segundo o teste t de Student para $p < 0,05$.

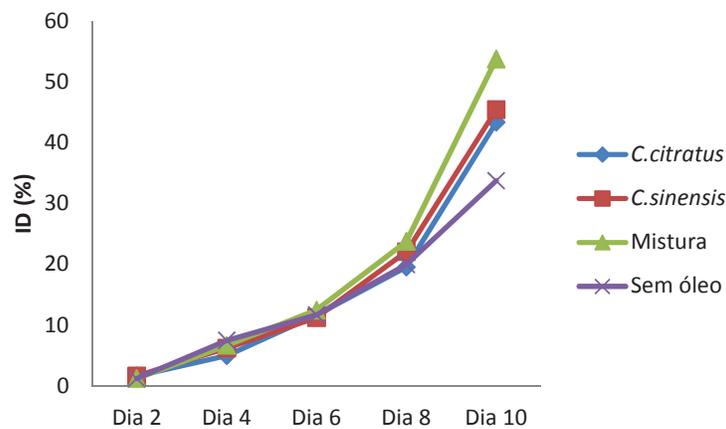


Figura 11 - Evolução do Índice de Doença (ID %) de acordo com os diferentes óleos essenciais ou mistura aplicados, em morangos inoculados com *B. cinerea*.

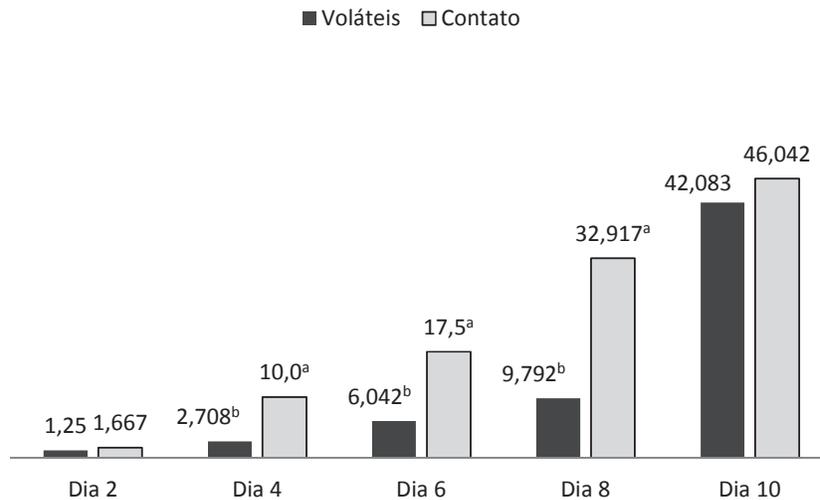


Figura 12 - Comparação do desempenho dos diferentes métodos de aplicação dos óleos essenciais, de acordo com o Índice de Doença (%) observado em morangos com inoculação de *B. cinerea*. Letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes segundo o teste t de Student para $p < 0,05$.

É válido comparar os efeitos de inibição observados aos encontrados por outros autores que utilizaram óleos essenciais para promover a inibição do crescimento fúngico em frutas. Assim, Reddy et al. (1998) submeteram morangos à ação dos compostos voláteis de duas diferentes cultivares de *Thymus vulgaris* e avaliaram o número de frutas infectadas em 7 e 14 dias por *B. cinerea* e *R. stolonifer*, inoculados artificialmente. Os autores obtiveram inibição significativa, a 0,05 %, do desenvolvimento de ambos os fungos, em três dosagens avaliadas (50, 100 e 200 ppm).

O óleo essencial de *C. citratus* foi, juntamente a outros óleos essenciais, testado quanto ao seu potencial de inibição de *B. cinerea* e *R. stolonifer* em morangos, por Vu et al. (2011). O método utilizado foi o de aspersão direta sobre as frutas da solução de concentração $0,2 \text{ mg.mL}^{-1}$ de óleo essencial. Os resultados obtidos indicaram que, a 4°C , o efeito de inibição foi percebido apenas até o quarto dia de avaliação. Do dia 6 ao dia 14, os morangos tratados com *C. citratus* apresentaram níveis de infecção pelos fungos iguais ou maiores que os do grupo controle.

Visando o controle de *C. gloeosporioides* em maracujá, Anaruma et al. (2010) aplicaram o óleo essencial de *C. citratus* nas dosagens de $0,12$ a $1,00 \text{ mg.mL}^{-1}$ por contato

direto, via imersão. Os resultados demonstraram inibição do crescimento fúngico até o sétimo dia de incubação, na dosagem de 0,12 mg.mL⁻¹.

Um ponto importante, como bem assinalaram Fisher e Phillips (2008), é que óleos essenciais de espécies de *Citrus* são “Geralmente Reconhecidos Como Seguros” (GRAS, da sigla em inglês) pela *Food and Drug Administration* (FDA) como aditivos alimentares, o que possibilita seu uso em diversas matrizes alimentares. Vale ressaltar também o trabalho de Costa et al. (2011), que demonstrou ser muito baixa a toxicidade do óleo essencial de *C. citratus* em ratos. Do mesmo modo, Duarte et al. (2012b) não encontraram efeito tóxico do mesmo óleo sobre leitões recém-desmamados.

5.4 Características físico-químicas

A partir dos resultados obtidos nos testes de simulação de armazenamento e de comercialização, o tratamento que mostrou melhor potencial para prolongamento de vida pós-colheita de morangos foi a aplicação da mistura dos óleos essenciais de *C. citratus* e *C. sinensis* em partes iguais. Por outro lado, o modo de aplicação que se mostrou mais efetivo foi o de contato direto na maior parte dos casos. Assim, estes dois parâmetros foram escolhidos para a realização dos testes de avaliação das características físico-químicas no decorrer do período de incubação.

5.4.1 Perda de massa

A massa dos morangos submetidos ao tratamento com a mistura dos óleos essenciais e os do grupo controle não apresentou diferença significativa, de acordo com o teste t de Student ($p < 0,05$). Ao final de 10 dias, as frutas tratadas apresentaram 94 % da massa inicial, enquanto o grupo controle manteve mais de 96 % de sua massa (Figura 13).

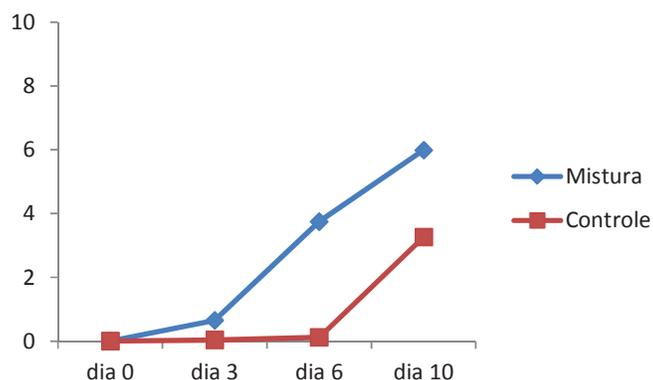


Figura 13 – Perda de massa (%) dos morangos tratados ou não tratados (controle) com a mistura dos óleos essenciais *C. sinensis*:*C. citratus* (1:1 – 1,0 mg.mL⁻¹), no decorrer do experimento.

5.4.2 Teor de sólidos solúveis, absorvância da polpa, pH e acidez total.

A Tabela 15 mostra os valores encontrados para os parâmetros teor de sólidos solúveis, pH, acidez total e absorvância da polpa. Foram observadas diferenças importantes apenas no nível de sólidos solúveis, onde o grupo controle se mostrou consideravelmente baixo no último dia de medição em comparação com o grupo submetido ao tratamento, e nos níveis de acidez total.

Tabela 15 – Parâmetros físico-químicos dos morangos com e sem tratamento com a mistura de óleos essenciais de *C. citratus* e *C. sinensis*.

	% Sólidos Solúveis		Absorvância		pH		Acidez Total (% ácido cítrico)	
	Misto	Sem óleo	Misto	Sem óleo	Misto	Sem óleo	Misto	Sem óleo
Dia 0 ¹	6,50	6,50	1,33	1,33	3,50	3,50	0,89	0,89
Dia 3	6,50	6,50	1,32	1,32	4,01	3,96	0,92 ^b	1,13 ^a
Dia 6	6,50	6,00	1,32	1,32	3,73	3,89	0,96 ^b	1,20 ^a
Dia 10	6,90 ^a	3,50 ^b	1,33	1,33	3,93	3,76	1,01 ^a	0,85 ^b

¹ Condições iniciais dos morangos.

Para cada parâmetro avaliado, letras diferentes na mesma linha indicam valores estatisticamente diferentes, segundo o teste t de Student (p<0,05).

5.5 Incorporação dos óleos essenciais em revestimentos comestíveis para controle do fungo *B. cinerea*.

A incorporação dos óleos essenciais à matriz de metil-celulose para a formação dos revestimentos comestíveis resultou em filmes de espessura média de 31 μ m, que foram colocados diretamente sobre o meio de cultura previamente inoculado com o *B. cinerea*, por espalhamento na superfície. Os resultados de desenvolvimento do fungo (UFC.mL⁻¹), nas condições empregadas estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 – Desenvolvimento do fungo *B. cinerea* no decorrer de sete dias de incubação – UFC.mL⁻¹ .10².

	Dia 0	Dia 3	Dia 5	Dia 7
MC (controle)	0	7,00	4,50	62,50
MC-Cs1	0	10,80	12,30	25,00
MC-Cs2	0	5,50	14,80	150,00
MC-Cs3	0	0,10	0,65	41,50
MC-Cc1	0	9,25	10,80	49,50
MC-Cc2	0	5,25	1,50	87,50
MC-Cc3	0	2,55	7,37	118,00

Legenda: MC = matriz de metil-celulose; Cs = *C.sinensis*; Cc= *C.citratius*; 1, 2 e 3 = dosagens de óleo essencial de 0,75; 1,50 e 3,00 mg.mL⁻¹, respectivamente.

A partir dos dados obtidos observa-se que, quando comparado ao grupo controle, o único revestimento que demonstrou inibição do crescimento fúngico durante o decorrer do ensaio foi o MC-Cs3, ou seja, a matriz de metil-celulose incorporada com óleo essencial de *C. sinensis* na dosagem de 3,00 mg.mL⁻¹. Neste caso, a presença do óleo essencial no revestimento comestível permitiu reduzir em um log, ou seja, em dez vezes o número de UFC.mL⁻¹ até o 5º dia do ensaio.

É possível fazer um paralelo dos resultados obtidos no presente trabalho com os encontrados por Perdones et al. (2012), que utilizaram óleo essencial de *Citrus limon* em uma matriz de quitosana contra *B.cinerea*, e a mesma metodologia utilizada no ensaio *in vitro*. As autoras constataram ação antimicrobiana promovida pelo filme do segundo ao quarto dia de duração do ensaio. No entanto, foi também utilizado outro filme, de mesma composição, que passou pelo processo de microfluidização. Este demonstrou resultados consideravelmente mais expressivos, podendo ser observado o efeito inibitório até o sétimo dia de experimento.

6 CONCLUSÕES

- Sete dos 10 óleos essenciais estudados apresentaram elevada atividade antifúngica *in vitro* contra *B. cinerea*, com valores de MIC de 0,06 a 0,5 mg.mL⁻¹, atividade comparável ao padrão antifúngico utilizado nos ensaios (Cercobin 700 WP – MIC 0,5 mg.mL⁻¹). Por outro lado, apenas o óleo de *C. citratus* foi fortemente ativo contra *C. gloeosporioides* (MIC 0,25 mg.mL⁻¹)

- O óleo essencial de *C. citratus* apresentou neral e geranial como componentes majoritários, perfazendo 2/3 da composição total deste óleo. O composto majoritário presente no óleo essencial de *C. sinensis* foi o limoneno, que representou mais de 87 % de sua composição total.

- Teste sob Condições Ambiente de Armazenamento:

- O óleo essencial de *C. citratus* (1,0 mg.mL⁻¹) apresentou ação antifúngica apenas em morangos naturalmente infectados até o quarto dia após o tratamento.

- O óleo essencial de *C. sinensis* (1,0 mg.mL⁻¹) apresentou ação antifúngica em morangos naturalmente infectados e nos inoculados com *C. gloeosporioides*, até o quarto dia de incubação após o tratamento.

- O método de aplicação dos óleos por contato direto apresentou-se mais eficiente.

- Nenhum óleo essencial apresentou atividade antifúngica *in vivo* contra *B. cinerea*.

- Teste sob Armazenamento Refrigerado

- A mistura em partes iguais (1:1 – 1,0 mg.mL⁻¹) dos óleos essenciais de *C. citratus*:*C. sinensis* demonstrou efeito inibitório do crescimento fúngico em morangos inoculados com *C. gloeosporioides*.

- O método de aplicação por contato direto mostrou-se mais eficiente no controle da infecção fúngica que o método por exposição aos compostos voláteis.

- Os óleos essenciais de *C. citratus* e *C. sinensis* combinados apresentaram melhor efeito inibitório contra a infecção fúngica do que quando aplicados isoladamente, o que demonstra sinergismo entre os compostos presentes nos óleos essenciais.

- Os parâmetros físico-químicos avaliados demonstraram haver poucas diferenças importantes entre os morangos tratados e não tratados com a mistura (1:1) dos óleos de *C. citratus* e *C. sinensis*, na concentração de 1,0 mg.mL⁻¹.

- A incorporação dos óleos essenciais a revestimentos comestíveis *in vitro* mostrou-se possível para ambos os óleos essenciais, e o efeito inibitório contra *B. cinerea* foi visualizado para o óleo de *C. sinensis*, na dosagem de 3,0 mg.mL⁻¹.

7 REFERÊNCIAS

ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. Allured Publ. Corp., Carol Stream, IL, 2007.

ALMEIDA, T.F.; CAMARGO, M.; PANIZZI, R.C. Efeito de extratos de plantas medicinais no controle de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da flor preta do morangueiro. **Summa Phytopathologica**, v.35, n.3, p.196-201, 2009.

AMINIFARD, M.H.; MOHAMMADI, S. Essential oils to control *Botrytis cinerea* *in vitro* and *in vivo* on plum fruits. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.93, p.348-353, 2012.

ANARUMA, N.D.; SCHMIDT, F.L.; DUARTE, M.C.T.; FIGUEIRA, G.M.; DELARMELINA, C.; BENATO, E.A.; SARTORATTO, A. Control of *Colletotrichum gloeosporioides* (penz.) Sacc. in yellow passionfruit using *Cymbopogon citratus* essential oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.41, p.66-73, 2010.

ANTUNES, L.E.C.; REISSER-JÚNIOR, C. – Fragole, i produttori brasiliani mirano all'exportazione in Europa. **Fruorticoltura**, v.69, p.60-65, 2007.

BASER, K.H.C.; BUCHBAUER, G. **Handbook of essential oils: Science, technology and applications**. Boca Raton – Florida. CRC Press. CRC Press, 2010, 975p.

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

BRAND, S.C. **Isolamento e identificação de substâncias provenientes da laranjeira “Valência” (*Citrus sinensis*) envolvidas no estímulo e/ou quebra da dormência de estruturas quiescentes de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da podridão floral dos citros.** 2012. 104p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

BROOKS, A.N. Anthracnose of strawberry caused by *Colletotrichum fragariae*. **Phytopathology**, n.21, p.739-744, 1931.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. A review. **International Journal of Food Microbiology**, v.94, p.223-253, 2004.

CACCIONI, D.R.L.; GUIZZARDI, M.; BIONDI, D.M.; RENDA, A.; RUBERTO, G. Relationship between volatile components of citrus fruit essential oil and antimicrobial action on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. **International Journal of Food Microbiology**, v.43, p.73-79, 1998.

CANTILLANO, R.F.F. Fisiologia e manejo na colheita e pós-colheita de morangos. **Anais do II Simpósio Nacional do Morango e I Encontro de Pequenas Frutas e Frutas Nativas do Mercosul**, 2004.

CASTRO, R.L. Melhoramento genético do morangueiro: Avanços no Brasil. **Anais do II Simpósio Nacional do Morango e I Encontro de Pequenas Frutas e Frutas Nativas do Mercosul**, 2004.

CHITARRA, M.I.F.; CHITARRA, A.B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio.** Ed. UFLA, 2005. 783p.

CHUTIA, M.; DEKA BHUYAN, P.; PATHAK, M.G.; SARMA, T.C.; BORUAH, P. Antifungal activity and chemical composition of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against phytopathogens from North East India. **LWT – Food Science and Technology**,

v.42, n.3, p.777-780, 2009.

CLSI. **Método de referência para testes de diluição em caldo para a determinação da sensibilidade a terapia antifúngica dos fungos filamentosos.** Norma Aprovada, M.38-A, 22. 2002, 50p.

CORDENUNSI, B.R.; NASCIMENTO, J.R.O.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Influence of Cultivar on Quality Parameters and Chemical Composition of Strawberry Fruits Grown in Brazil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.2581-2586, 2002.

CORDERO, A.P.; SIERRA, J.R., ANAYA, L.C.; PALENCIA, K.P. Evaluación *in vitro* de la actividad inhibitoria de extractos vegetales sobre aislados de *Colletotrichum* spp. **Acta Agronómica**, v.60, n.2, p.158-164, 2011.

COSTA, C.A.R.A.; BIDINOTTO, L.T.; TAKAHIRA, R.K.; SALVADORI, D.M.F.; BARBISAN, L.F.; COSTA, M. Cholesterol reduction and lack of genotoxic effects in mice after repeated 21-day oral intake of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oil. **Food and Chemical Toxicology**, v.49, p.2268-2272, 2011.

DAROLT, M.R. Morango orgânico: opção sustentável para o setor. **Revista Campo & Negócios**, ano II, v.34, p.58-61, 2008.

DARROW, G.M. **The Strawberry.** History, Breeding and Physiology. Holt, Rinehart and Winston, New York, 1966. 447p.

DIÁNEZ, F.; SANTOS, M.; BLANCO, R.; TELLO, J.C. Fungicide resistance in *Botrytis cinerea* isolates from strawberry crops in Huelva (Southwestern Spain). **Phytoparasitica**, v.30, n.5, p.529-534, 2002.

DIAS-ARIEIRA, C.R.; FERREIRA, L.R.; ARIEIRA, J.O.; MIGUEL, E.G.; DONEGA,

M.A.; RIBEIRO, R.C.F. Atividade do óleo de *Eucalyptus citriodora* e *Azadirachta indica* no controle de *Colletotrichum acutatum* em morango. **Summa Phytopathologica**, v.36, n.3, p.228-232, 2010.

DOMINGUES, R.J.; YOUNG, M.C.M.; TOFOLI, J.G. MATHEUS, D.R. Potencial antifúngico de extratos de plantas e de basidiomicetos nativos sobre *Colletotrichum acutatum*, *Alternaria solani* e *Sclerotium rolfsii*. **Summa Phytopathologica**, v.37, n.3, p.149-151, 2011.

DUARTE, M.C.T.; DUARTE, R.M.T.; SOUSA, D.P.; BERSAN, S.M.F. Antimicrobial activity and action mechanisms of essential oils. p.173-199. In: SOUSA, D.P. (ed.) **Medicinal Essential Oils**. Nova Science Publishers Inc., 2012a. 236p.

DUARTE, M.C.T.; FIGUEIRA, G.M.; FOGGIO, M.A.; RODRIGUES, R.A.; CORAUCCI NETO, D.; RUIZ, A.L.T.G.; CARVALHO, J.E. **Micropartículas de óleos essenciais e seus usos para prevenção de doenças entéricas**, PI1020120219751, 31/08/2012. 2012b.

FAOSTAT. **Estatísticas da Organização para a Agricultura e Alimentação das Nações Unidas – FAO**. 2012. Disponível em: faostat.fao.org, acesso em setembro de 2014.

FISHER, K.; PHILLIPS, C. Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer? **Trends in Food Science & Technology**, v.19, p.156-164, 2008.

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

GALEGÁRIO, F.F.; AMARO, M.; WEIHMANN, C.R.; SANHUEZA, R.M.V.; FREIRE, J.M.; AMARANTE, C.V.T.; SANTOS, H.P.; BENDER, R.J.; PALOMBINI, M.C.; PROTAS, J.F.S.; COUTINHO, E.F. Sistema de produção de morango para mesa na região da Serra Gaúcha e Encosta Superior do Nordeste. **Embrapa Uva e Vinho**. Sistema de

Produção, v.6, 2005. Versão eletrônica disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Morango/MesaSerraGaucha/colheita.htm>. Acesso em janeiro de 2015.

GOUVEA, A.; KUHN, O.J.; MAZARO, S.M.; MIO, L.L.M; DESCHAMPS, C.; BIASI, L.A.; FONSECA, V.C. Controle de doenças foliares e de flores e qualidade pós-colheita do morangueiro tratado com *Saccharomyces cerevisiae*. **Horticultura Brasileira** v.27, p.527-533, 2009.

GUIMARÃES, L.G.L.; CARDOSO, M.G.; SOUSA, P.E.; ANDRADE, J.; VIEIRA, S.S. Antioxidant and fungitoxic activities of the lemongrass essential oil and citral. **Revista Ciência Agronômica**, v.42, n.2, p.464-472, 2011.

HAMMER, K.A.; CARSON, C.F.; RILEY, T.V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **Journal of Applied Microbiology**, v.86, p.985-990, 1999.

HANNUM, S.M. Potential impact of strawberries on human health: a review of the science. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.44, n.1, p.1-17. 2004.

HENZ, G.P.; BOITEUX, L.S.; LOPES, C.A. Outbreak of strawberry caused by *Colletotrichum acutatum* in Central Brazil. **Plant Disease**, v.76, 1992.

HOWARD, C.M.; MAAS, J.L.; CHANDLER, C.K.; ALBREGTS, E.E. Anthracnose of strawberry caused by the *Colletotrichum* complex in Florida. **Plant Disease**, v.76, p.976-981, 1992.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Censo Agropecuário 2006**. Segunda Apuração: Brasil, Grandes Regiões e Unidades da Federação. Rio de Janeiro, 2012.

IGARASHI, S. **Sensibilidade a fungicidas e caracterização morfológica de**

***Colletotrichum* spp. do morango (*Fragaria* spp.).** 1984. 63 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1984.

KADER, A.A. (Edr.) **Postharvest Technology for Horticultural Crops.** University of California, Oakland, EUA. 2002.

KERLING, L.C.P. Fungi in the phyllosphere of leaves of rye and strawberry. **Med Landb Hogesch Opzoekstns Gent**, v. 29, p.885-895, 1964.

KRISTO, E.; KOUTSOUMANIS, K.P.; BILIADERIS, C.G. Thermal, mechanical and water vapor barrier properties of sodium caseinate films containing antimicrobials and their inhibitory action on *Listeria monocytogenes*. **Food Hydrocolloids**, v.22, p.373-386, 2008.

LIMA, L.O. Qualidade, colheita e manuseio pós-colheita de frutos de morangueiro. **Informe Agropecuário**, Belo horizonte, n.20, v.198, p.80-83, 1999.

LIZANA, A.L. Factores fisiológicos relacionados con el deterioro de frutas y hortalizas después de cosechadas. In: **Primer Simposio Sobre Manejo, Calidad, Cosecha y Post-Cosecha de Frutas y Hortalizas.** Santiago, Chile. 1975.

LOPES, U.P. **Podridão pós-colheita em morango: etiologia e efeito de produtos alternativos.** 2011. 55 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011.

LORENZETTI, E.R.; MONTEIRO, F.P.; SOUZA, P.E.; SOUZA, R.J.; SCALICE, H.K.; DIOGO JR, R.; PIRES, M.S.O. Bioatividade de óleos essenciais no controle de *Botrytis cinerea* isolado de morangueiro. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.13, especial, p.619-627, 2011.

MENEZES, M. Aspectos biológicos e taxonômicos de espécies do gênero *Colletotrichum*.

Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica, v.3, p.170-179, 2006.

MERTELY, J.C.; PERES, N.A. *Botrytis* fruit rot or grey mold of strawberry. **Series of Plant Pathology Department** - Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. 2009, 230p.

MISHRA, A; SIRADHANA, B.S. Studies on the survival of sorghum anthracnose (*Colletotrichum graminicola*) pathogen. **Phillippine Agriculture**, v.62, p.149-152, 1979.

NABIGOL, A.; MORSHEDI, H. Evaluation of the antifungal activity of the Iranian thyme essential oils on the postharvest pathogens of strawberry fruits. **African Journal of Biotechnology**, v.10, n.48, p.9864-9869. 2011.

NARUZAWA, E.S.; PAPA, M.F.S. Antifungal activity of extracts from brazilian Cerrado plants on *Colletotrichum gloeosporioides* and *Corynespora cassicola*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.13, n.4, p.408-412, 2011.

OHNO, T.; MASAKAZU, K.; YAMAOKA, Y.; IMAMURA, S.; YAMAMOTO, T.; MITSUFUJI, S.; KODAMA, T.; KASHIMA, K.; IMANISHI, J. Antimicrobial activity of essential oils against *Helicobacter pylori*. **Helicobacter**, v.8, n.3, 2003.

OLIVEIRA, R.P.; SCIVITTARO, W.B. Produção de frutos de morango em função de diferentes períodos de vernalização das mudas. **Horticultura Brasileira**, v.27, p.91-95, 2009.

PERDONES, A.; SÁNCHEZ-GONZALES, L.; CHIRALT, A.; VARGAS, M. Effect of chitosan-lemon essential oil coatings on storage-keeping quality of strawberry. **Postharvest Biology and Technology**, v.70, p.32-41, 2012.

PERES, N.A.R.. KURAMAE, E.E.; DIAS, M.S.C.; SOUZA, N.L. Identification and characterization of *Colletotrichum* spp. affecting fruit after harvest in Brazil. **Journal of**

Phytopathology v.150, p.128-134, 2002.

PERES, N.A.; TIMMER, L.W.; ADASKAVEG, J.E.; CORRELL, J.C. Lifestyles of *Colletotrichum acutatum*. **Review of Plant Disease**, v.89, p.784-796, 2005.

PINELI, L.L.O. **Qualidade e potencial antioxidante *in vitro* de morangos in natura e submetidos a processamentos**. 2009. 222 p. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2009.

PRUSKY, D. Pathogen quiescence in postharvest diseases. **Annual Review of Phytopathology**, v.34, p.413-434, 1996.

RAHMAN, M.; AHMAD, S.H.; MOHAMED, M.T.M.; RAHMAN, M.Z.A. Extraction of *Jatropha curcas* fruits for antifungal activity against anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) of papaya. **African Journal of Biotechnology**, v.10, n.48, p.9796-9799, 2011.

REDDY, M.V.B.; BELKACEMI, K.; CORCUFF, R.; CASTAIGNE, F. ARUL, J. Effect of pre-harvest chitosan sprays on post-harvest infection by *Botrytis cinerea* and quality of strawberry fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v.20, p.39-51, 2000.

REDDY, M.V.B.; ANGERS, P.; GOSSELIN, A.; ARUL, J. Characterization and use of essential oil from *Thymus vulgaris* against *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer* in strawberry fruits. **Phytochemistry**, v.47, n.8, p.1515-1520, 1998.

RESENDE, L.M.A.; MASCARENHAS, M.H.T.; PAIVA, B.M. Panorama da produção e comercialização do morango. **Informe agropecuário**, v.20, n.198, p.5-19, 1999.

ROCHA, D.A.; ABREU, C.M.P., CORRÊA, A.D.; SANTOS, C.D.; FONSECA, E.W.N. Análise Comparativa de Nutrientes Funcionais em Morangos de Diferentes Cultivares da Região de Lavras-MG. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v.30, n.4, p.1124-1128. 2008.

SÁNCHEZ-GONZALES, L.; CHÁFER, M.; CHIRALT, A.; GONZÁLES-MARTÍNEZ, C. Physical properties of edible chitosan films containing bergamot essential oil and their inhibitory action on *Penicillium italicum*. **Carbohydrate Polymers**, v.82, p.277-283, 2010.

SANHUEZA, R.M.V.; HOFFMANN, A.; ANTUNES, L.E.C.; FREIRE, J.M. – Sistema de produção de vinho para mesa na região da Serra Gaúcha e encosta superior do nordeste. **Embrapa Uva e Vinho**, Sistema de produção, v.6, 2005. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Morango/MesaSerraGaucha/importancia.htm>. Acesso em fevereiro de 2013.

SILVA, A.F.; DIAS, M.S.C.; MARO, L.A.C. Botânica e fisiologia do morangueiro. **Informe Agropecuário**, v.28, p. 7-13, 2007.

SIMMONDS, J.H. A study of the species of *Colletotrichum* causing ripe fruit rots in Queensland. **Queensland Journal of Agricultural and Animal Sciences**. v.22, p.437-459, 1965.

SMITH, B.J. Strawberry Anthracnose: Progress toward Control through Science. **International Journal of Food Science**, v.13, p.91-102, 2013.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ª ed., Ed.UFSC 2007. 1104p.

SOARES, A.G. **Perdas pós-colheita de frutas e hortaliças**. Fórum de Agronegócio da Unicamp – Qualidade e Segurança de Alimentos. Campinas, 2009.

STASHENKO, E.E.; MARTÍNEZ, R.; PINZON, M.H.; RAMIREZ, J. Changes in chemical composition of catalytically hydrogenated Orange oil (*Citrus sinensis*). **Journal of Chromatography A**, v.752, n.1-2, p.217-222, 1996.

SUTTON, B.C. The Genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. p.1-23. In: BAILEY, J.; JEGER, M.J. (eds.) ***Colletotrichum: Biology, Pathology and Control***. CAB International, 1992. 388p.

SUTTON, J. Botrytis fruit rot (gray mould) and blossom blight. , p.28-31. In: MAAS, J. L. (ed.) ***Compendium of strawberry diseases***. APS Press, St. Paul, 1998. 98p.

TANAKA, M.A.S.; PASSOS, F.A. Caracterização patogênica de *Colletotrichum acutatum* e *C.fragariae* associados à antracnose do morangueiro. ***Fitopatologia Brasileira***, v.27, n.5, p.484-488, 2002.

TANAKA, M.A.S.; BETTI, J.A.; KIMATI, H. Doenças do morangueiro. p.489-499. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (eds.). ***Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas***. 4ª edição. São Paulo, Agronômica Ceres, 2005.

THOMPSON, A.K. ***Fruit and Vegetables: Harvesting, Handling and Storage***, Blackwell Publishing Ltd. 2003, 486p.

TZORTZAKIS, N.G. Maintaining postharvest quality of fresh produce with volatile compounds. ***Innovative Food Science and Emerging Technologies***, v.8, p.111-116, 2007.

UENO, B. Antracnose do morangueiro (“Flor Preta”). ***Informe da Pesquisa – Instituto Agrônômico do Paraná***. Ano 9, n.119, 1996.

UENO, B. Manejo integrado de doenças do morango. ***II Simpósio Nacional do Morango e I Encontro de Pequenas Frutas e Frutas Nativas do Mercosul***, 2004.

VIDAL, W.N.; VIDAL, M.R.N. Ordem Rosales. Família Rosaceae. In: ***Taxonomia Vegetal*** (Caderno Didático 57, Departamento de Biologia vegetal) Viçosa, Editora UFRV,

2003. 89p.

VILELA, G.R.; ALMEIDA, G.S.; REGITANO-D'ARCE, M.A.B.; MORAES, M.H.D.; BRITO, J.O.; SILVA, M.F.G.F.; SILVA, S.C.; PIEDADE, S.M.S.; CALORI-DOMINGUES, M.A.; GLORIA, E.M. Activity of essential oil and its major compound, 1,8-cineole, from *Eucalyptus globulus* Labill., against the storage fungi *Aspergillus flavus* Link and *Aspergillus parasiticus* Speare. **Journal of Stored Products Research** v.45, p.108-111, 2009.

VIUDA-MARTOS, M.; RUIZ-NAVAJAS, Y.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J. Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. **Food Control**, v.19, p.1130-1138, 2008.

VU, K.D.; HOLLINGSWORTH, R.G.; LEROUX, E.; SALMIERI, S.; LACROIX, M. Development of edible bioactive coating based on modified chitosan for increasing the shelf life of strawberries. **Food Research International**, v.44, p.198-203, 2011.

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

XU, W.T.; HUANG, K.L.; GUO, F.; QU, W.; YANG, J.J.; LIANG, Z.H.; LUO, Y.B. Postharvest grapefruit seed extract and chitosan treatments of table grapes to control *Botrytis cinerea*. **Postharvest Biology and Technology**, v.46, p.86-94, 2007.

XU, X.; WEDGWOOD, E.; BERRIE, A.M.; ALLEN, J.; O'NEILL, T.M. Management of raspberry and strawberry grey mould in open field and under protection. A review. **Agronomy for Sustainable Development**. v.32, p.531-543, 2012.

YAMASHITA, F.; VEIGA, G.F.; BENASSI, M.T.; ROBERTO, S.R. Morangos embalados

com filme de Policloreto de Vinila. **Semina**: Ciências Agrárias, v.27, n.3, p.429-436, 2006.