



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA AGRÍCOLA**

ADRIANE MARIA DA SILVA

**EFICIÊNCIA DE TECNOLOGIAS LIMPAS NO CONTROLE DA PODRIDÃO
AZEDA EM LARANJA 'LIMA'**

CAMPINAS

2022

ADRIANE MARIA DA SILVA

**EFICIÊNCIA DE TECNOLOGIAS LIMPAS NO CONTROLE DA PODRIDÃO
AZEDA EM LARANJA ‘LIMA’**

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia Agrícola da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Agrícola, na área de Tecnologia Pós-Colheita.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Juliana Aparecida Fracarolli

Coorientador: Dr. Daniel Terao

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELA ALUNA ADRIANE
MARIA DA SILVA, E ORIENTADA PELA
PROF^ª. DR^ª. JULIANA APARECIDA
FRACAROLLI.

CAMPINAS

2022

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Elizangela Aparecida dos Santos Souza - CRB 8/8098

Si38e Silva, Adriane Maria da, 1993-
Eficiência de tecnologias limpas no controle da podridão azeda em laranja
'Lima' / Adriane Maria da Silva. – Campinas, SP : [s.n.], 2022.

Orientador: Juliana Aparecida Fracarolli.
Coorientador: Daniel Terao.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade
de Engenharia Agrícola.

1. Radiação ultravioleta. 2. Tratamento hidrotérmico. I. Fracarolli, Juliana
Aparecida, 1984-. II. Terao, Daniel. III. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia Agrícola. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Efficiency of clean technologies in the control of sour rot in 'Lima'
orange

Palavras-chave em inglês:

Ultraviolet radiation

Hydrothermal treatment

Área de concentração: Tecnologia Pós-Colheita

Titulação: Mestra em Engenharia Agrícola

Banca examinadora:

Juliana Aparecida Fracarolli [Orientador]

Franciane Colares Souza Usberti

Katia de Lima Nechet

Data de defesa: 28-04-2022

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Agrícola

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0001-6547-552>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/1273135207408777>

Este exemplar corresponde à redação final da **Dissertação de Mestrado** defendida por **Adriane Maria da Silva**, aprovada pela Comissão Julgadora em 28 de abril de 2022, na Faculdade de Engenharia Agrícola da Universidade Estadual de Campinas.

FEAGRI

Profª Drª Juliana Aparecida Fracaroli – Presidente e Orientadora

Profª Drª Franciane Colares Souza Usberti – Membro Titular

Drª Katia de Lima Nechet – Membro Titular

Faculdade de
Engenharia Agrícola
Unicamp

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade

DEDICO

*A Deus,
pois sem ele nada seria possível,
aos meus pais Cícero Luíz da Silva e
Sônia Aparecida Niculuzio Silva,
e a toda comunidade científica.*

AGRADECIMENTOS

Ao Nosso Senhor Jesus Cristo e a Nossa Senhora Aparecida por abençoar cada etapa da realização desse projeto e colocar em meu caminho pessoas de bom coração. Agradeço a Prof^a Dr^a Juliana Aparecida Fracarolli pela oportunidade em ser minha orientadora, por todas as vezes que conversamos sempre me recebendo tão gentil, amável e disposta a ajudar. Ao pesquisador Dr. Daniel Terao por toda a sua bondade, paciência, pelos conselhos, pela ajuda em cada etapa da realização dessa dissertação e por todo o conhecimento transmitido. Obrigada por essa parceria que vem desde a graduação.

À Kátia de Lima Nechet e ao doutorando Valdeir Nunes por todo o ensinamento e disponibilidade em ajudar na etapa da identificação molecular. E a doutoranda Larissa Rocha Terra pelo apoio no planejamento experimental e na otimização dos experimentos.

À empresa Alfacitrus por apoiar o projeto de pesquisa e pelo fornecimento das laranjas ‘Lima’ para realização dos experimentos, em especial à Marcella Buzo e demais funcionários. Obrigada pela parceria!

À Embrapa Meio Ambiente, em Jaguariúna/SP, pela disponibilização da estrutura laboratorial e equipamentos necessários para a realização dos experimentos. À Rosely dos Santos Nascimento, Neusa Domingos e Elke Simoni Dias Vilela do Laboratório de Microbiologia Ambiental da Embrapa Meio Ambiente por todo o apoio na realização dos experimentos e das análises físico-químicas. Agradeço a pesquisadora Dra^a Aline de Holanda Nunes Maia pelo apoio na realização das análises estatísticas.

À minha querida amiga Onara Oliveira de Lima pelo encorajamento na realização do mestrado. Foi a partir daquela nossa conversa que as coisas tomaram um rumo diferente. Agradeço também a Juliana Oliveira, Janaína Oliveira Ryal e ao Lucas Eduardo Durante da Silva por todo o apoio e incentivo nesta fase da minha vida. Vocês são muito especiais!

À Universidade Estadual de Campinas, em especial a Faculdade de Engenharia Agrícola (FEAGRI) pela oportunidade na realização do mestrado. Agradeço a Valéria Altmann Ferreira e a Fernanda Von Hertwig Mascarenhas Fontes, da Coordenação de pós-graduação, sempre muito atenciosas e prestativas. Ao Prof^o Dr. Rafael Augustus de Oliveira por disponibilizar o Colorímetro e as funcionárias técnicas do laboratório de pós-colheita da FEAGRI, Rosa Helena Aguiar e Adriana Naomi Owada Ono pela ajuda na realização das análises de cor. A Prof^a Dr^a

Thaís Queiroz Zorzeto César por conceder a experiência em ser PED em sua disciplina e por ter a oportunidade de aprender a arte de lecionar. E a Prof^a Dr^a Franciane Colares Souza Usberti e Dr. Murillo Freire Júnior, pelas orientações valiosas durante o exame de Qualificação.

E ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos (nº projeto: 830527/1999-0).

Agradeço a todos, que direta ou indiretamente, mesmo não sendo mencionados, contribuíram para a realização desse trabalho. Meu muito obrigada!

RESUMO

A laranja ‘Lima’ é uma fruta de grande potencial econômico, principalmente para consumo *in natura*. No entanto, perdas pós-colheita significativas têm ocorrido especialmente devido a podridão azeda. A demanda por tecnologias limpas e eficazes no controle do patógeno aumentou, visto que há falta de métodos eficazes e seguros, alternativos ao uso de agroquímicos. Primeiramente, devido à incerteza quanto ao agente causal da doença, visto que existem duas espécies fúngicas citadas na literatura, realizou-se a identificação morfológica e molecular de um isolado de uma amostra de laranja “Lima” sintomática coletada no produtor na cidade de Engenheiro Coelho/SP. O resultado da identificação revelou que o agente causal é o *Geotrichum citri-aurantii*. Objetivou-se, então, neste projeto avaliar a eficiência de tecnologias limpas, aplicadas individualmente ou combinadas, no controle do *G. citri-aurantii*, por meio de ensaios *in vitro* e *in vivo* na pós-colheita em laranja ‘Lima’. Duas tecnologias foram estudadas: Radiação UV-C nas doses 0,10; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 kJ/m² e tratamento hidrotérmico por imersão em água quente a temperatura entre 60,3 e 71,7°C e tempo de exposição entre 15 a 49 segundos. Os ensaios para avaliar as combinações de temperatura e tempo de exposição no tratamento hidrotérmico e no tratamento combinado (hidrotérmico + UV-C) foram otimizadas utilizando o planejamento experimental CCD. Os estudos *in vitro* mostraram que a exposição a dose de radiação UV-C a partir de 0,10 kJ/m² inibiu completamente a germinação de esporos, no entanto, não inibiu totalmente o crescimento micelial mesmo na dose de radiação UV-C de 5 kJ/m². Os testes *in vitro* demonstraram que a temperatura de 62°C por 35 segundos foi suficiente para inibir a germinação de esporos, sendo necessários 45 segundos para inibir o crescimento micelial. No entanto, os ensaios *in vivo* demonstraram que o tratamento hidrotérmico em temperaturas elevadas não foi eficiente no controle da podridão azeda, uma vez que danificava a epiderme da fruta, aumentando a severidade da doença. Os resultados dos ensaios *in vivo* revelaram que o melhor resultado no controle da podridão azeda em laranja ‘Lima’ foi obtido em frutas submetidas a radiação a dose de 4 kJ/m². Com base nas análises físico-químicas, a radiação UV-C preservou a firmeza e qualidade da cor da epiderme da fruta, e retardou o processo de senescência das laranjas.

Palavras-chave: tratamento hidrotérmico, radiação UV-C, *Geotrichum citri-aurantii*.

ABSTRACT

The 'Lima' orange is a fruit with expressive economic potential, mainly as a fresh fruit consumption. However, significant postharvest losses have occurred, especially due to sour rot. The demand for clean and effective technologies controlling the pathogen has increased; since there is a lack of effective and safe methods, an alternative to agrochemicals. Firstly, due to the uncertainty regarding the causal agent of the disease, since there are two fungal species mentioned in the Literature, morphological and molecular identification of an isolate from a symptomatic "Lima" orange sample collected from the producer in the city of Engenheiro Coelho/SP was carried out. The result of the molecular identification revealed that the causal agent is *Geotrichum citri-aurantii*. The objective of this project was to evaluate the efficiency of clean technologies, applied individually or in combination, in the control of *G. citri-aurantii*, through *in vitro* and *in vivo* assays in postharvest of 'Lima' orange. Two technologies were studied: UV-C radiation at the dose 0,10; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 and 5,0 kJ/m² and hydrothermal treatment by immersion in hot water at temperatures between 60,3 and 71,7°C and exposure time between 15 and 49 seconds. The CCD experimental designer optimized the assays to evaluate the combinations of temperature and exposure time in hydrothermal and combined treatments (hydrothermal + UV-C). *In vitro* studies showed that exposure to a dose of UV-C radiation from 0,10 kJ/m² completely inhibited spore germination, but could not completely inhibit mycelial growth, even at the dose of 5 kJ/m². *In vitro* tests, showed that the temperature of 62°C for 35 seconds was sufficient to inhibit spore germination, requiring 45 seconds to inhibit mycelial growth. Nonetheless, *in vivo* assays demonstrated that hydrothermal treatment at elevated temperatures was not efficient in controlling sour rot, since it damaged the fruit epidermis, increasing the severity of the disease. The *in vivo* assays results revealed that the best result in the control of sour rot in "Lima" orange was obtained in fruits submitted to UV-C radiation at a dose of 4 kJ/m². Based on the physicochemical analyses, UV-C radiation preserved the peel's firmness and color quality and delayed the senescence process of oranges.

Keywords: Hydrothermal Treatment, UV-C Radiation, *Geotrichum citri-aurantii*

LISTA DE ABREVIATURAS

UV-C	Ultravioleta C
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em cadeia de polimerase)
VHT	<i>Vapor Heat Treatment</i> (Tratamento por vapor)
HWD	<i>Hot Water Dipping</i> (Imersão em água quente)
HWRB	<i>Hot Water Rinsing And Brushing</i> (Lavagem e escovação com água quente)
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Ácido Desoxirribonucleico)
PET	Polietileno Tereftalato
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i> (Espaçador transcrito interno)
SSU	<i>Small Subunit</i> (Subunidade pequena)
LSU	<i>Large Subunit</i> (Subunidade grande)
CMAA	Coleção de Microrganismos de Importância Agrícola e Ambiental
dNTP	<i>Deoxynucleoside triphosphate</i> (Desoxirribonucleotídeo Trifosfato)
BDA	Batata Dextrose Ágar
CTAB	<i>Cetyl-Trimethyl-Ammonium Bromide</i> (Brometo de Cetil-Trimetil- Amônio)
SL	<i>Solution Lysis</i> (Solução de Lise)
IRS	<i>Inhibitor Removal Solution</i> (Solução de Remoção de inibidores)
SB	<i>Solution Bind</i> (Solução de ligação)

CB	<i>Cleaning Solution</i> (Solução de limpeza)
EB	<i>Elution Buffer</i> (Tampão de Eluição)
SS	<i>Sum of Squares</i> (Soma quadrática)
MS	<i>Mean Squares</i> (Média quadrática)
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i> (Análise de Variância)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Laranja ‘Lima’ com sintoma de podridão azeda. A coloração branca é resultado da formação de artroconídios.	32
Figura 2. Espectro eletromagnético (Adaptado de UFRGS, 2022).....	36
Figura 3. Objetos utilizados para realizar o teste de ferimento nas laranjas ‘Lima’: A) prego com 2 x 1 mm (largura x profundidade); B) agulha de aço com 1 x 2 mm e C) agulha com 0,5 x 1 mm.....	43
Figura 4. Sala climatizada, localizada no setor de Campos Experimentais na Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP utilizada para armazenamento das laranjas ‘Lima’.....	44
Figura 5. Preparo da microcultura. Desenho esquemático criado com BioRender (https://biorender.com/).....	46
Figura 6.. Etapas do processo de identificação molecular. Desenho esquemático criado com BioRender (https://biorender.com/).....	47
Figura 7. Laranjas ‘Lima’ utilizadas nos testes preliminares.....	55
Figura 8. A) Aspecto macroscópico da colônia de <i>Geotrichum</i> sp. com 7 dias de crescimento cultivada em meio de cultura batata dextrose ágar (BDA) a 23±2°C com luz natural (sem controle de fotoperíodo) em uma sala climatizada (placa de Petri 90 x 15 mm) e B) estrutura morfológica, com a presença de hifas septadas e formação de artroconídios, observados ao microscópio com aumento de 40 vezes.	56
Figura 9. Árvore filogenética <i>multilocus</i> gerada a partir do método da máxima parcimônia das sequências ITS e LSU, mostrando a relação do isolado com outras espécies relacionadas. A espécie externa é o <i>Geotrichum klebahnii</i> . A identificação ao lado do nome corresponde a cultura e entre parênteses é a numeração de identificação no Genbank.....	58
Figura 10. Procedimento para realização do experimento para avaliar o efeito do tratamento hidrotérmico na inibição da germinação de artroconídios do <i>Geotrichum citri-aurantii</i>	60
Figura 11. Protótipo para aplicação da radiação UV-C, utilizado nos experimentos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	65
Figura 12. Gráfico de Pareto obtido através do planejamento composto central (CCD) para verificar a significância de cada variável ($p \leq 0,05$).....	70
Figura 13. Gráficos de superfície de resposta (A) e de contorno (B) obtidos a partir do planejamento composto central para avaliar o efeito do tempo (s) e temperatura (°C) na germinação de esporos de <i>Geotrichum citri-aurantii</i>	70

Figura 14. Gráfico de Pareto obtido através do planejamento composto central (CCD) para observar o efeito da variável tempo (s) e temperatura (°C) no crescimento micelial de <i>Geotrichum citri-aurantii</i>	72
Figura 15. Gráficos de superfície de resposta (A) e de contorno (B) obtidos a partir do planejamento composto central (CCD) para otimização da temperatura (°C) e tempo de exposição (s) na inibição do crescimento micelial de <i>Geotrichum citri-aurantii</i>	73
Figura 16. Número de unidade formadora de colônias (UFCs) de <i>Geotrichum citri-aurantii</i> , após a exposição à radiação UV-C nas doses: Testemunha = 0 kJ/m ² (0 s); Dose 1 = 0,01 kJ/m ² (2,8 s); Dose 2 = 0,02 kJ/m ² (5,6 s); Dose 3 = 0,025 (7 s); Dose 4 = 0,05 (14 s); Dose 5 = 0,10 kJ/m ² (28 s); Dose 6 = 0,20 kJ/m ² (56 s) e Dose 7 = 0,25 kJ/m ² (70 s).	74
Figura 17. Crescimento micelial de <i>Geotrichum citri-aurantii</i> submetido à radiação UV-C nas seguintes doses: Testemunha = 0 kJ/m ² (0 min); Dose 1 = 0,25 kJ/m ² (70 s); Dose 2 = 0,5 kJ/m ² (140 s); Dose 3 = 1,0 kJ/m ² (280 s); Dose 4 = 2,0 kJ/m ² (560 s); Dose 5 = 3,0 kJ/m ² (840 s); Dose 6 = 4,0 kJ/m ² (1120 s); Dose 7 = 5,0 kJ/m ² (1400 s). As barras verticais representam o erro padrão das estimativas das médias dos tratamentos.	75
Figura 18. Dendrograma obtido da análise de agrupamento hierárquico do resultado da medição do diâmetro da colônia de <i>Geotrichum citri-aurantii</i> , submetido a diferentes doses de radiação UV-C: Testemunha = 0 kJ/m ² (0 min); Dose 1 = 0,25 kJ/m ² (70s); Dose 2 = 0,5 kJ/m ² (140 s); Dose 3 = 1,0 kJ/m ² (280 s); Dose 4 = 2,0 kJ/m ² (560 s); Dose 5 = 3,0 kJ/m ² (840 s); Dose 6 = 4,0 kJ/m ² (1120 s); Dose 7 = 5,0 kJ/m ² (1400 s).	76
Figura 19. Gráfico de Pareto para avaliar o efeito das variáveis de três variáveis: tempo (s), temperatura (°C) e tempo de aplicação da radiação UV-C (s) na germinação de esporos de <i>G.citri-aurantii</i>	78
Figura 20. Gráficos de Superfície de resposta (A e C) e de contorno (B e D) obtidos a partir do planejamento composto central para otimização da temperatura (°C) e tempo (s) no tratamento hidrotérmico e tempo de exposição (s) em radiação UV-C na germinação de esporos de <i>Geotrichum citri-aurantii</i>	79
Figura 21. Experimento <i>in vivo</i> para avaliar o efeito do tratamento hidrotérmico no controle de <i>Geotrichum citri-aurantii</i> em laranja ‘Lima’.	82
Figura 22. Gráfico de Pareto obtido a partir do planejamento composto central para otimização da temperatura (°C) e tempo de exposição (s) no tratamento hidrotérmico para avaliar o efeito <i>in vivo</i> na severidade da podridão azeda em laranja ‘Lima’	87

- Figura 23.** Gráfico de superfície de resposta (A) e de contorno (B) obtidos a partir do planejamento composto central para otimização da temperatura (°C) e tempo de exposição (s) no tratamento hidrotérmico *in vivo* para controle da podridão azeda em laranja ‘Lima’ (causada por *Geotrichum citri-aurantii*) 88
- Figura 24.** Resultado da matriz de planejamento utilizada para construção da superfície de resposta do efeito do tratamento hidrotérmico no controle da podridão azeda causada por *Geotrichum citri-aurantii*. Laranjas ‘Lima’ foram submetidas ao tratamento hidrotérmico a temperatura entre 60,3 a 71,7°C e 15 a 49 segundos. À direita é apresentado o grau de severidade da doença, corresponde a alguns tratamentos, aos doze dias de armazenamento a 28±2°C e 70±2% de umidade relativa. Os valores em vermelho representam o tamanho da lesão das frutas apresentadas. 89
- Figura 25.** Curva de progresso da lesão da podridão azeda em laranja ‘Lima’, quantificada através do diâmetro médio da lesão 6 dias após as frutas serem inoculadas. As frutas foram inoculadas artificialmente com *Geotrichum citri-aurantii* e irradiadas com sete diferentes doses (tratamentos) de UV-C: Testemunha = 0 kJ/m² (0 s); Dose 1 = 0,10 kJ/m² (28 s); Dose 2 = 0,50 kJ/m² (140 s); Dose 3 = 1,0 kJ/m² (280 s); Dose 4 = 2,0 kJ/m² (560 s); Dose 5 = 3,0 kJ/m² (840 s); Dose 6 = 4,0 kJ/m² (1120 s) e Dose 7 = 5,0 kJ/m² (1400 s). Após o tratamento as frutas foram armazenadas a temperatura de 28±2°C e 70±2% de umidade relativa por 12 dias. As barras verticais representam o erro padrão das estimativas das médias dos tratamentos..... 90
- Figura 26.** Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) (equação 6) para os valores do diâmetro médio da lesão (mm) de *Geotrichum citri-aurantii* em laranja ‘Lima’. Após o tratamento as frutas foram armazenadas a temperatura de 28±2°C e 70±2% de umidade relativa por 12 dias. Cada coluna corresponde à média de 20 repetições. As letras diferentes acima da coluna indicam diferença significativa entre os tratamentos (Scott Knott, p≤0,05) e as barras verticais o erro padrão das estimativas das médias. 91
- Figura 27.** Curva de progresso da lesão da podridão azeda em laranja ‘Lima’, quantificada através do diâmetro médio da lesão 6 dias após as frutas terem sido tratadas e armazenadas. As frutas foram inoculadas artificialmente com *Geotrichum citri-aurantii* e receberam os seguintes tratamentos: Testemunha (frutas que não foram submetidas a nenhum tratamento), TT= Tratamento Térmico (62°C por 44 segundos), UV-C (4 kJ/m²) e TT combinado com a radiação UV-C (62°C por 44 segundos e 4 kJ/m²). As barras verticais representam o erro padrão das estimativas das médias dos tratamentos. 93

Figura 28. Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) (equação 6) para os valores do diâmetro médio da lesão (mm) de <i>Geotrichum citri-aurantii</i> em laranja ‘Lima’, durante 12 dias de avaliação. Os tratamentos avaliados foram: Testemunha (frutas que não foram submetidas a nenhum tratamento), TT = Tratamento Térmico (62°C por 44 segundos), UV-C (4 kJ/m ²) e TT combinado com UV-C (62°C por 44 segundos e 4 kJ/m ²), armazenadas a temperatura de 28±2°C e 70±2% de umidade relativa por 12 dias. Cada coluna corresponde à média de 20 repetições. As letras diferentes acima da coluna indicam diferença significativa entre os tratamentos (Scott Knott, p≤0,05) e as barras verticais o erro padrão das estimativas das médias.	94
Figura 29. Resultado das análises dos atributos de qualidade: A) Acidez total; B) pH; C) sólidos solúveis; D) Firmeza; E) parâmetro de cor L*; F) parâmetro de cor c*; G) parâmetro de cor h* e laranjas ‘Lima’ submetidas a radiação UV-C (4 kJ/m ²) e armazenadas a temperatura ambiente, a 23±2°C.	103
Figura 30. Representação de um sistema cartesiano com os pontos experimentais para dois (A) e três fatores (B) (Adaptado de Teófilo e Ferreira, 2006).	132
Figura 31. Representação geométrica dos efeitos em um planejamento para dois fatores (Neto et al., 2010). O efeito individual é o contraste entre arestas opostas (a, b) e o efeito de interação é o contraste entre duas diagonais (c).	136
Figura 32. Representação geométrica dos efeitos em um planejamento para três fatores (Neto et al., 2010).	137
Figura 33. Representação do modelo CIE LAB e da direção dos eixos L*, a* e b* (Adaptado de Ferreira e Spricigo, 2017).	138
Figura 34. Representação do Diagrama das coordenadas cromáticas a* e b* (Adaptado de Leite, 2006).	139

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentração e quantidade para 1 e 5 reações dos reagentes utilizados na etapa da amplificação.....	50
Tabela 2. Condições para amplificação da região ITS, SSU e LSU.....	51
Tabela 3. Níveis e fatores utilizados no planejamento composto central esférico (CCD) para avaliar o efeito do tratamento hidrotérmico na germinação de esporos de <i>Geotrichum citri-aurantii</i>	61
Tabela 4. Matriz de planejamento composto central esférico (CCD) com os níveis codificados e decodificados no estudo de duas variáveis (temperatura e tempo) para avaliar o efeito <i>in vitro</i> do tratamento hidrotérmico na diminuição das unidades formadoras de colônias (UFC) de <i>Geotrichum citri-aurantii</i>	62
Tabela 5. Níveis e fatores utilizados no planejamento composto central esférico (CCD) para avaliar o efeito do tratamento hidrotérmico no crescimento micelial de <i>Geotrichum citri-aurantii</i>	63
Tabela 6. Matriz de planejamento composto central esférico (CCD) com os níveis codificados e decodificados no estudo de duas variáveis (temperatura e tempo) para avaliar o efeito <i>in vitro</i> do tratamento hidrotérmico na diminuição do crescimento micelial de <i>Geotrichum citri-aurantii</i>	64
Tabela 7. Níveis e fatores utilizados no planejamento composto central esférico (CCD) para avaliar o efeito da temperatura e da radiação UV-C na germinação de esporos de <i>Geotrichum citri-aurantii</i>	67
Tabela 8. Matriz de planejamento composto central esférico (CCD) com os níveis codificados e decodificados para estudo de três variáveis (temperatura, tempo de exposição ao tratamento hidrotérmico e tempo de UV-C), para avaliar o efeito combinado do tratamento hidrotérmico e da radiação UV-C na diminuição das unidades formadoras de colônias (UFC) de <i>Geotrichum citri-aurantii</i>	68
Tabela 9. Tabela da Análise da variância (ANOVA) para os resultados obtidos no planejamento experimental para avaliar o efeito do tempo (s) e temperatura (°C) na germinação de esporos de <i>Geotrichum citri-aurantii</i>	69
Tabela 10. Análise de variância (ANOVA) para os resultados obtidos no planejamento experimental para avaliar o efeito do tempo (s) e temperatura (°C) no crescimento micelial de <i>Geotrichum citri-aurantii</i>	72

Tabela 11. Resultado do teste Scott-Knott para comparar o efeito de diferentes doses de radiação UV-C no crescimento micelial de <i>Geotrichum citri-aurantii</i> . As médias seguidas pelas mesmas letras são significativamente diferentes de acordo com o teste de Scott-Knott, em que $p \leq 0,05$	77
Tabela 12. Análise de variância (ANOVA) para os resultados obtidos no planejamento experimental para avaliar o efeito de três variáveis: tempo (s), temperatura (°C) e tempo de aplicação da UV-C (s) na germinação de esporos de <i>Geotrichum citri-aurantii</i>	78
Tabela 13. Fatores e níveis estudados no planejamento composto central (CCD) para avaliar o efeito <i>in vivo</i> do tratamento hidrotérmico na severidade da podridão azeda em laranja ‘Lima’	83
Tabela 14. Matriz de planejamento composto central (CCD) com os níveis codificados e decodificados para estudo de duas variáveis (temperatura e tempo de exposição) para avaliar o efeito <i>in vivo</i> do tratamento hidrotérmico na severidade da podridão azeda em laranja ‘Lima’	83
Tabela 15. Análise de variância (ANOVA) para os resultados obtidos no planejamento experimental (CCD) para avaliar o efeito <i>in vivo</i> da temperatura (°C) e tempo de exposição (s) na severidade da podridão azeda em laranja ‘Lima’	86
Tabela 16. Porcentagem de controle da podridão azeda causada por <i>Geotrichum citri-aurantii</i> em laranja ‘Lima’ após os tratamentos e armazenadas a temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$ e $70 \pm 2\%$ de umidade relativa, por 12 dias.....	92
Tabela 17. Porcentagem de controle da podridão azeda causada por <i>Geotrichum citri-aurantii</i> em laranja ‘Lima’ após os tratamentos: TT = Tratamento Térmico (62°C por 35 segundos), UV-C (4 kJ/m^2) e TT + UV-C (62°C por 44 segundos e 4 kJ/m^2) armazenadas a temperatura $28 \pm 2^\circ\text{C}$ e $70 \pm 2\%$ de umidade relativa por 12 dias.....	95
Tabela 18. Resultados das médias e desvio padrão dos atributos de qualidade de laranjas ‘Lima’ submetidas ao tratamento com radiação UV-C (4 kJ/m^2) e armazenadas a temperatura ambiente ($23 \pm 2^\circ\text{C}$).	100
Tabela 19. Exemplo de uma matriz de planejamento para dois e três fatores.....	133
Tabela 20. Exemplo de níveis dos fatores utilizados no planejamento composto central (CCD) para avaliar o efeito da temperatura e da pressão no rendimento de uma reação.....	134
Tabela 21. Matriz de coeficientes de contraste para um planejamento para dois fatores ($k=2$) e para três fatores ($k=3$).....	136

SUMÁRIO

1. APRESENTAÇÃO DA IDEIA DO PROJETO.....	22
2. INTRODUÇÃO	23
3. OBJETIVOS	26
3.1. Objetivo geral.....	26
3.2. Objetivos específicos.....	26
4. REVISÃO DE LITERATURA.....	27
4.1. A origem <i>Citrus</i>	27
4.2. Laranja ‘Lima’	27
4.3. Perdas pós-colheita.....	30
4.4. <i>Geotrichum</i> spp.	31
4.5. Métodos alternativos para controle de fungos patogênicos	33
4.5.1. Tratamento com água quente	33
4.5.2. Radiação ultravioleta C para controle de doenças pós-colheita.....	33
4.5.3. Tratamentos combinados para controle de doenças fúngicas pós-colheita.....	33
5. CAPÍTULO I: COLETA, ISOLAMENTO, TESTES PRELIMINARES E IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DO AGENTE CAUSAL DA PODRIDÃO AZEDA EM LARANJA ‘LIMA’	40
5.1. RESUMO.....	40
5.2. MATERIAL E MÉTODOS	41
5.2.1. Coleta da amostra e isolamento do agente causal	41
5.2.2. Testes preliminares.....	41
5.2.2.1. Teste 1 - Concentração da suspensão, objeto para ferimento da fruta e período de incubação em câmara úmida	41
5.2.3. Teste de patogenicidade	44
5.2.4. Identificação das características morfológicas do fungo.....	45
5.2.5. Identificação molecular	46

5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
5.3.1. Testes preliminares.....	54
5.3.2. Identificação das características morfológicas.....	55
5.3.3. Identificação molecular do fungo.....	56
5.4. CONCLUSÃO.....	58
6. CAPÍTULO II: ESTUDOS <i>IN VITRO</i>: EFEITO DA TEMPERATURA E DA RADIÇÃO UV-C NO DESENVOLVIMENTO DE <i>Geotrichum citri-aurantii</i>.	59
6.1. RESUMO.....	59
6.2. MATERIAL E MÉTODOS	60
6.2.1. Efeito da temperatura no controle de crescimento do fungo.....	60
6.2.1.1. Efeito na inibição da germinação de esporos	60
6.2.1.2. Efeito da temperatura na inibição do crescimento micelial	62
6.2.2. Efeito da radiação UV-C no controle de crescimento do fungo	64
6.2.2.1. Protótipo para aplicação da Radiação UV-C.....	64
6.2.2.2. Efeito da radiação UV-C na inibição da germinação de esporos	65
6.2.2.3. Efeito da radiação UV-C na inibição do crescimento micelial	66
6.2.3. Combinação da temperatura e da radiação UV-C.....	66
6.2.3.1. Efeito do tratamento combinado na inibição da germinação de esporos	66
6.2.4. Análise dos dados.....	68
6.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	69
6.3.1. Efeito da temperatura	69
6.3.1.1. Efeito na inibição da germinação de esporos	69
6.3.1.2. Efeito da temperatura no crescimento micelial	71
6.3.2. Efeito da radiação UV-C	74
6.3.2.1. Efeito da radiação UV-C na inibição da germinação de esporos do <i>G. citri- aurantii</i>	74
6.3.2.2. Efeito da radiação UV-C no crescimento micelial do <i>G. citri-aurantii</i>	75

6.3.3. Efeito da temperatura combinada com a radiação UV-C na inibição da germinação de esporos de <i>G. citri-aurantii</i>	77
6.4. CONCLUSÃO	80
7. CAPÍTULO III: ESTUDOS <i>IN VIVO</i>: EFEITO DA TEMPERATURA E DA RADIAÇÃO UV-C NO CONTROLE DA PODRIDÃO AZEDA EM LARANJA ‘LIMA’	81
7.1. RESUMO	81
7.2. MATERIAL E MÉTODOS	82
7.2.1. Preparo das laranjas ‘Lima’ e inoculação artificial com a suspensão do <i>G. citri-aurantii</i>	82
7.2.2. Efeito da temperatura e tempo de exposição no controle da podridão azeda em laranja ‘Lima’	82
7.2.3. Efeito da radiação UV-C no controle a podridão azeda em laranja ‘Lima’	84
7.2.4. Tratamento hidrotérmico combinado com a radiação UV-C	84
7.2.5. Análise estatística	85
7.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	85
7.3.1. Efeito da temperatura e tempo de exposição no controle da podridão azeda em laranja ‘Lima’	85
7.3.2. Efeito da radiação UV-C no controle da podridão azeda em laranja ‘Lima’	90
7.3.3. Efeito combinado do tratamento hidrotérmico e radiação UV-C no controle da podridão azeda em laranja ‘Lima’	93
7.4 CONCLUSÃO	95
8. CAPÍTULO IV: ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS: EFEITO DO TRATAMENTO COM RADIAÇÃO UV-C NOS ASPECTOS QUALITATIVOS DA LARANJA ‘LIMA’ PÓS COLHEITA	97
8.1 RESUMO	97
8.2. MATERIAL E MÉTODOS	98
8.2.1. Preparo das frutas e aplicação da radiação UV-C	98
8.2.2. Análise estatística	99

8.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	100
8.4. CONCLUSÃO.....	100
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105
10. APÊNDICE	129
11. ANEXO	131
11.1. Anexo I - Planejamento experimental multivariado.....	131
11.2. Anexo II - Modelo CIE (1976).....	138

1. APRESENTAÇÃO DA IDEIA DO PROJETO

A motivação para a realização desse projeto surgiu a partir da ocorrência de perdas significativas de laranjas após colhidas. Verificamos que as maiores perdas ocorriam durante o período chuvoso no Estado de São Paulo, Brasil e principalmente em laranjas da variedade ‘Lima’, causadas por doenças fúngicas e que os controles convencionais para essas doenças, usando fungicidas nos tratamentos pós-colheita, não estavam sendo eficientes no controle da doença.

Propusemos, então, o presente projeto visando a identificação específica do agente causal da doença e estudar métodos alternativos de controle usando o tratamento hidrotérmico e a radiação ultravioleta C.

Assim, organizou-se o estudo do mestrado e essa dissertação foi escrita em capítulos, sendo que primeiramente é apresentada uma introdução e revisão bibliográfica sobre frutas cítricas, perdas na pós colheita, doenças fúngicas em frutas cítricas, fungicidas e os métodos de controle de doenças alternativos avaliados. No Capítulo I são abordadas as etapas preliminares realizadas desde a coleta de amostras de laranjas sintomáticas, o isolamento e a identificação específica do agente causal, além de definição da metodologia de inoculação e armazenamento das frutas, usados nas etapas seguintes. O Capítulo II apresenta os estudos *in vitro* do efeito da temperatura e da radiação UV-C na germinação de esporos e no crescimento micelial, definindo-se a faixa de temperatura e dose de UV-C letais ao fungo. No Capítulo III, com base nos resultados observados no estudo *in vitro*, são apresentados os resultados obtidos nos estudos *in vivo* onde laranjas inoculadas artificialmente com o fungo foram submetidas aos tratamentos hidrotérmico e à radiação UV-C, individualmente e integrados, determinando-se o melhor tratamento para controlar a doença. E por fim no Capítulo IV são apresentadas as análises físico-químicas que demonstram o efeito do tratamento de controle sugerido nas características de qualidade da fruta.

Apesar das limitações e dificuldades impostas pela pandemia do Covid-19 nos últimos dois anos, conseguimos realizar os trabalhos e obter resultados bastante satisfatórios, com o apoio conjunto da Embrapa Meio Ambiente, da empresa Alfacitrus e da Unicamp.

2. INTRODUÇÃO

A produção de frutas cítricas é alta em todo o mundo, sendo as variedades mais conhecidas: o limão, a laranja e a tangerina (Mohammed e Qoronfleh; 2020). A produção mundial de *Citrus* em 2020 foi de 98 milhões de toneladas, sendo 48 milhões de toneladas somente de laranjas (USDA, 2021). O Brasil é o maior produtor da fruta, na safra de 2019 produziu cerca de 17 milhões de toneladas em uma área de 590 mil hectares, com um valor de produção de R\$ 9 milhões (USDA, 2021; Anuário Brasileiro de Horti e Fruti, 2021). A produção mais expressiva de laranja é no estado de São Paulo, com uma produção anual em torno de 13 milhões de toneladas (Anuário Brasileiro de Horti e Fruti, 2021).

Em contrapartida, temos as perdas relacionadas à pós-colheita de frutas que podem ser ocasionadas por diferentes fatores: fisiológico (causados por condições de estresse como temperatura ou umidades extremas), mecânico (causados por queda ou compressão), ou ação microbiana (infecção devido ao ataque de fungos e bactérias), sendo a perda causada por patógenos a mais expressiva (Chitarra e Chitarra, 2005). Mesmo em países desenvolvidos a perda devido ao ataque de microrganismos pode chegar a um quinto da produção (Singh *et al.*, 2021). Em áreas típicas com predominância de chuvas de verão as infecções por patógenos geralmente são altas, pois fatores ambientais como temperatura e umidade favorecem o ataque e a multiplicação de microrganismos (Singh *et al.*, 2021; Passos *et al.*, 2019). As perdas refletem não somente no desperdício do produto, mas em toda a cadeia envolvida na produção, como semente, água para a irrigação, fertilizante e mão de obra (Singh *et al.*, 2021).

Em frutas cítricas, os fungos são os principais causadores de doenças pós-colheita. As frutas cítricas saudáveis possuem pH ácido, tornando um ambiente propício para o desenvolvimento de fungos e não de bactérias (Ladaniya, 2008). O principal meio de infecção é através de fissuras na epiderme da fruta. Dentre os patógenos de feridas, destacam-se: o bolor verde (*Penicillium digitatum*), o bolor azul (*Penicillium Italicum*) e a podridão azeda (*Geotrichum spp.*) (Zacarias *et al.*, 2020).

A podridão azeda é a segunda doença fúngica que mais acomete frutas cítricas (Michailides *et al.*, 2007). Foi detectada pela primeira vez na Califórnia em 1976 (Wells, 1976), e a sua incidência tem aumentado nos últimos anos, principalmente em estações chuvosas (Soto-Muñoz *et al.*, 2020).

Os fungicidas aplicados na pós-colheita fazem parte da estratégia de controle para prevenir a germinação de esporos e controle do crescimento micelial (Asrey e Das, 2021). De acordo com o Relatório de comercialização de agrotóxicos no Brasil, emitido pelo IBAMA (2020), a produção nacional em 2020 foi de 502.848 toneladas de agrotóxicos. Os fungicidas mais utilizados em frutas cítricas, são: o tiabendazol ($C_{10}H_7N_3S$) e o imazalil ($C_{14}H_{14}Cl_2N_2O$) (Smilanick *et al.*, 2020), porém apresentam controle mais eficaz em *Penicillium* spp., não apresentando efeitos significativos no controle da podridão azeda (Soto-Muñoz *et al.*, 2020).

A guazatina ($C_{18}H_{41}N_7$) possui uma boa eficácia no controle de *Geotrichum* spp., no entanto foi proibido a partir de 2011 em vários países, inclusive no Brasil (Liu *et al.*, 2019). Outro fungicida que apresenta controle da podridão azeda é o propiconazol ($C_{15}H_{17}Cl_2N_3O_2$) (Mckay *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2019), mas devido aos riscos de seus ingredientes para o meio ambiente e a saúde humana, a União Europeia, através do Regulamento 2018/1865 (Comission, 2018), proibiu a utilização comercial deste produto (Bazioli *et al.*, 2019), ocasionando a falta de um fungicida eficaz para o controle da doença.

Além disso, são inúmeros os malefícios que são causados por essas substâncias químicas. Nos últimos nove anos (2011 a 2020) observou-se um aumento significativo de publicações referentes ao uso de agrotóxicos e os impactos negativos que eles causam ao meio ambiente (Belsky e Joshi, 2020; Zubrod *et al.*, 2019), à saúde dos trabalhadores agrícolas (Stoleski *et al.*, 2019; Martin *et al.*, 2018) e à população (Evangelou *et al.*, 2016; Islam, *et al.*, 2021). Segundo a *Pubmed*, uma ferramenta de busca de periódicos acadêmicos, há mais de 80 mil documentos de pesquisa referente a esse assunto. No ano de 2020, foi contabilizado mais de 9 mil publicações relacionando o uso de fungicidas e a saúde dos trabalhadores.

A atual estratégia de controle das doenças fúngicas pós-colheita de *Citrus* é a aplicação de fungicidas. No entanto existem poucos princípios ativos para essa finalidade. Desde a introdução na década de 60 e 70, respectivamente (Harding, 1962; Frossard *et al.*, 1977), o tiabendazole e o imazalil tornaram-se a primeira escolha para a aplicação no controle de *Penicillium* spp. na pós-colheita em *Citrus*, que apresentam ação protetora pela inibição da esporulação dos fungos em frutas infectadas. Embora menos eficiente, o imazalil também é aplicado no controle de *Alternaria* spp. e *Geotrichum* spp. Na União Europeia, o ingrediente ativo imazalil está sendo revisado, devido à incerteza na toxicidade de alguns metabólitos (Smilanick *et al.*, 2020). O pirimetanil e o fludioxonil foram introduzidos na indústria recentemente (Smilanick *et al.*, 2006; D'Aquino *et al.*, 2013) para controle do bolor verde, no

entanto apresentou baixa eficiência (Kellerman *et al.*, 2018). O propiconazol era utilizado no controle da podridão azeda e bolor verde, no entanto sua utilização nos tratamentos pós-colheita foi proibida nos países da União Europeia (Mckay *et al.*, 2012). A guazatina é utilizada no controle da podridão azeda e do bolor verde em alguns países, como África do Sul e Austrália, no entanto, seu uso é proibido na União Europeia, EUA e Canadá (Adaskaveg e Foster, 2009).

O uso frequente de fungicidas vêm causando preocupações quanto aos efeitos à saúde humana, ao meio ambiente, bem como o desenvolvimento de patógenos resistentes (Phonyiam *et al.*, 2021). Os primeiros fungicidas utilizados nas culturas para proteção contra patógenos foram os carbamatos de metil benzimidazol. Em 50 anos de uso, a resistência foi relatada em mais de 100 patógenos. Em alguns a resistência surgiu em apenas 1 ano de uso (Grimmer *et al.*, 2015). A resistência ao inibidor quinona (limita a produção de energia dos fungos, evitando que os esporos germinem), foi relatada em quase 50 espécies de plantas e ao azol a 30 espécies em mais de sessenta países em 20 anos de uso (FAC, 2020; Fisher *et al.*, 2018). Os fungicidas mais comuns atuam interrompendo funções bioquímicas no patógeno, inibindo a respiração celular e a biossíntese do esterol (componente da membrana celular dos fungos) (Hu e Chen, 2021). Desde a década de 70 a resistência a fungicidas em fungos fitopatogênicos emergiu como um grande problema. A resistência dos patógenos aos fungicidas se deve à redução da sensibilidade a determinados agentes antifúngicos, normalmente devido a mutações gênicas. Enquanto o fungicida mata as cepas sensíveis, as resistentes tornam-se dominantes ao longo do tempo, causando um problema no controle da doença (Sánchez-Torres, 2021).

Vários problemas de saúde são causados por exposição direta aos agrotóxicos, dentre eles problemas respiratórios e neurológicos (Buralli *et al.*, 2018; Stoleski *et al.*, 2019; Linaker e Smedley, 2002), incluindo Parkinson (Islam *et al.*, 2021; Perrin *et al.*, 2021) e Alzheimer (Aloizou *et al.*, 2020). A exposição também pode contribuir para surgimento de diabetes tipo 2 (Hernandez-Mariano *et al.*, 2022; Mansouri e Reggabi, 2022; Han *et al.*, 2020), pois as substâncias acumulam-se nos tecidos, ocasionando uma inflamação crônica e reduzindo a ação da insulina (Evangelou *et al.*, 2016). Tem sido sugerido que os pesticidas ocasionam a alteração na estrutura do Ácido Desoxirribonucleico (DNA) ou surgimento de células mutantes, contribuindo com o desenvolvimento de câncer de cólon (Martin *et al.*, 2018), bexiga (Mortazavi *et al.*, 2019) e pescoço (Leonel, 2021). Martin *et al.* (2018), observaram que houve aumento da mortalidade por câncer de cólon nas últimas décadas nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, e que esse aumento está correlacionado com a quantidade de agrotóxicos vendidos no país. Em estudos experimentais na França, os fungicidas mostraram evidências cancerígenas.

Os agricultores que cultivam vinhas, frutas, batatas e beterrabas apresentaram riscos de tumores duas a três vezes maior após a exposição a essas substâncias químicas (Piel *et al.*, 2019).

Nos ecossistemas aquáticos, os fungicidas podem causar mortalidade e malformação, afetando o crescimento e desenvolvimento de peixes e anfíbios (Zhu *et al.*, 2014). A aplicação excessiva também pode contribuir com altas concentrações de fungicidas nos solos (Kelepertzis, 2014). Na Grécia, 22% das amostras de solo coletados de pomares de *citrus* estavam altamente contaminados devido ao amplo uso de fungicidas (Triantafyllidis *et al.*, 2020).

Há necessidade de opções para que o mundo alcance um futuro alimentar sustentável (Alamar *et al.*, 2018). Portanto é necessário estimular a inovação tecnológica a desenvolver e comercializar novas tecnologias sustentáveis.

Portanto, existe uma demanda evidente por estratégias alternativas ao uso de agroquímicos no controle das doenças pós-colheita em frutas. A utilização de tratamentos físicos como: hidrotérmico e a radiação ultravioleta C são alternativas promissoras, pois têm se mostrado eficazes no controle de doenças pós-colheita por serem tecnologias seguras e permitem manter a qualidade do produto (Usall *et al.*, 2016).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar a eficiência do tratamento hidrotérmico e da radiação UV-C utilizados individualmente ou combinados, no controle da podridão azeda na pós-colheita em laranja ‘Lima’.

3.2. Objetivos específicos

- Identificar a espécie de *Geotrichum* associado à podridão azeda em laranja ‘Lima’ (Capítulo I).
- Determinar a concentração da suspensão, objeto para ferimento e período de incubação em câmara úmida para inoculação das laranjas ‘Lima’ (Capítulo I);
- Avaliar por meio de estudos *in vitro* o efeito da temperatura e da radiação UV-C na germinação de esporos e no crescimento micelial de *Geotrichum* sp. (Capítulo II);

- Avaliar em estudos *in vivo* o efeito do tratamento hidrotérmico e da radiação UV-C no controle da severidade da podridão azeda em laranja ‘Lima’ e determinar o (s) melhor (es) tratamento (s) no controle da doença (Capítulo III);
- Avaliar por meio dos parâmetros físico-químicos qualitativos (pH, acidez total, sólidos solúveis, firmeza e cor) o efeito do (s) tratamento (s) na qualidade da laranja ‘Lima’ (Capítulo IV).

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1. A origem Citrus

Acredita-se que as laranjas tenham se originado das regiões tropicais e subtropicais do Sudeste Asiático há pelo menos 4.000 anos (Webber, 1967). Hoje, são culturas importantes no Extremo Oriente, África do Sul, Austrália, em toda a área do Mediterrâneo e áreas subtropicais da América do Sul e Caribe, e têm sido amplamente produzidas no Brasil, Estados Unidos, China, Índia e México, e menos na Espanha, Egito, Irã, Itália, Turquia e Grécia (Tutem *et al.*, 2020). Cada espécie de laranja possui características específicas de formato, tamanho, coloração e textura. São frutas de uma árvore de porte pequeno, chamada laranjeira. Este por sua vez apresenta flores brancas, pequenas e com um perfume delicado (Tutem *et al.*, 2020).

As frutas cítricas pertencem à família das *Rutaceae*, que inclui seis diferentes gêneros: *Citrus*, *Fortunella*, *Poncirus*, *Microcitrus*, *Clymenia* e *Eremocitrus* (Ollitrault *et al.*, 2020). O gênero *Citrus* constitui as espécies de frutas cítricas mais consumidas e comercializadas no mundo (Ollitrault *et al.*, 2020). Há centenas de espécies, sendo as mais comuns:

- *Citrus reticulata* – pertencem a esse grupo as tangerinas, que possuem como característica a casca solta e de cor alaranjada (Kimball, 1999). Ocupam o segundo lugar das laranjas de importância global (Baral *et al.*, 2021).
- *Citrus aurantifolia* - pertencem a esse grupo os limões e a lima ácida, ou lima da Pérsia (Chávez-González *et al.*, 2016; Kimball, 1999).
- *Citrus aurantium* - são as laranjas azedas ou amargas, geralmente cultivadas em países como Espanha, França e Japão (Kimball, 1999; Forsyth e Damiani, 2003).
- *Citrus sinensis* L. Osbeck ou laranja doce - é a espécie mais importante comercialmente para o processamento de suco ou consumo *in natura*. Cerca de dois terços das frutas cítricas produzidos no mundo, pertencem a esse grupo. São frutas que possuem entre 5 e 9 cm de

diâmetro (Ollitrault *et al.*, 2020). As laranjas doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck) podem ser classificadas em diferentes categorias (Chávez-González *et al.*, 2016):

- Laranja Baía – têm como característica uma protuberância na extremidade oposta ao pedúnculo. São frutas que não possuem sementes.
- Laranja comum – constituem as variedades mais utilizadas para o processamento de sucos, como a variedade Pêra e Valência.
- Laranja sanguínea – possuem polpa avermelhada, devido ao alto teor do pigmento antocianina (Latado *et al.*, 2008). Geralmente são cultivadas em países como Egito e Marrocos.
- Laranjas sem ácido – são laranjas com sabor menos ácido e mais doce que as demais variedades. Seu consumo geralmente é *in natura*, pois para processamento, devido a sua baixa acidez, pode contribuir para o crescimento de microrganismos patogênicos. É cultivada em vários países, mas em cada um recebe um nome diferente: na França é conhecida como Douce, na Espanha como Sucrena e no Brasil como Lima, que é o objeto de estudo deste trabalho.

4.2. Laranja ‘Lima’

A laranja ‘Lima’ (*Citrus sinensis* L. Osbeck var. *Lima*) é uma fruta com 6,5 a 9,5 cm de diâmetro, de casca grossa, enrugada e cor amarela-esverdeada a laranja intenso (Santos, 2016). Sua polpa é formada por gomos preenchidos com vesículas contendo suco, e protegidos por uma película branca chamada albedo. Tais gomos ficam reunidos ao redor de um núcleo central, onde localizam-se as sementes (Laste *et al.*, 2003). O suco possui cor amarelo claro e gosto insípido devido à baixa acidez, sendo recomendada para bebês e gestantes (Domingues, 1998). Por possuir menos ácido deteriora-se com mais facilidade (Santos, 2016). É a segunda variedade de laranja mais comercializada na CEAGESP (2019), sendo encontrada em todos os meses do ano, porém com maior oferta nos meses de julho a outubro (Strano *et al.*, 2016).

É uma fruta não climatérica pois apresenta atividade respiratória baixa e constante, com uma ligeira diminuição após a colheita (Strano *et al.*, 2016). Portanto ela deve ser colhida quando atingir o pico de maturidade. A maturação caracteriza-se pelo aumento do suco, a diminuição do teor de acidez e aumento dos sólidos solúveis, além do desenvolvimento da cor, passando de tons verdes para tons alaranjados (Alves e Melo, 2001).

Para a produção de *citrus*, a temperatura ideal é entre 23 e 32°C com umidade relativa (UR) acima de 40% (Junior *et al.*, 2005). E no processo de colheita, as frutas são colhidas com auxílio de uma tesoura ou alicate e acomodadas em caixas plásticas ou sacos. Geralmente, o ponto de colheita se define pelo grau de sólidos solúveis de 9 a 11 °Brix. Após a colheita das frutas, recomenda-se que sejam levadas direto ao *packing-house*, onde serão descartadas as frutas danificadas (Magalhães *et al.*, 2005; Fagundes, 2001), lavadas, polidas, enceradas, classificadas e embaladas de acordo com seu destino (Alves e Melo, 2001).

As laranjas doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck,) de maneira geral, são suscetíveis a lesão por frio a temperaturas de armazenamento abaixo de 7°C, podendo sofrer alterações metabólicas internas durante o armazenamento (Pratella, *et al.*, 1969). Segundo Rapisarda *et al.* (2008), laranjas ‘Valência’ e ‘Tarocco’ armazenadas a temperatura de 6°C por 65 dias apresentaram aumento no teor de antocianina, flavanonas (principal flavonóide nas laranjas), e uma ligeira diminuição na vitamina C (ácido ascórbico).

Nas últimas décadas os consumidores estão mais conscientes do valor da qualidade das frutas e produtos hortícolas e estão dando ênfase na qualidade da sua alimentação (Batt, 2006; Djekic *et al.*, 2019). Frutas e vegetais constituem uma parte importante de uma dieta saudável. O suco, casca, folhas e flores de laranja têm sido usadas como medicina tradicional. As principais propriedades medicinais da laranja incluem efeitos antibacterianos, antifúngicos, antidiabéticos, cardioprotetores, anticancerígenos e anti-inflamatórios (Tutem *et al.*, 2020; Musumeci *et al.*, 2019). Esses benefícios para a saúde são resultado de vitaminas, especialmente vitamina C e grande quantidade de micronutrientes como fósforo, magnésio, potássio, vitamina A, B e E, cálcio e fibras alimentares (Ma *et al.*, 2020; Celano *et al.*, 2019). Embora o suco e a polpa de laranja sejam reconhecidos como uma importante fonte de vitamina C, partes não comestíveis, como a epiderme da fruta, também contêm essa vitamina (Nagy, 1980). Um exemplo é a laranja ‘Lima’, cuja polpa e casca apresentam alto teor de ácido ascórbico (43,3 g por 100 g de casca fresca e 46,1 g por 100 mL de polpa) (Barros *et al.*, 2012). A maior quantidade de carboidrato (açúcar) no suco de laranja é a sacarose, seguida pela frutose e glicose (Tutem *et al.*, 2020). Segundo Couto e Brazaca (2010), 200 mL de suco de laranja ‘Lima’ contém cerca de 80 calorias, 20g de carboidrato, 22 mg de magnésio, 1g de fibra e 260 mg de potássio. Na família das laranjas, a ‘Lima’ ocupa o terceiro lugar na concentração de vitamina C, perdendo para a laranja ‘Natal’ e ‘Baía’ (Couto e Brazaca, 2010).

4.3 Perdas pós-colheita

Com a projeção do aumento da população para 9 bilhões em 2050, a demanda por alimentos tende a aumentar em 50% (Searchinger *et al.*, 2018). Além disso, neste século, o mundo caminha para um aumento de temperatura de 1,5°C (UNEP, 2020). Estima-se que cerca de 1,3 bilhões de toneladas de alimentos são perdidos e desperdiçados em todo mundo a cada ano, e em 2030 pode atingir 12,3 bilhões de toneladas. Reduzir as perdas e o desperdício evitaria o aumento da necessidade de terras agrícolas e contribuiria para reduzir a emissão de gases do efeito estufa (Flanagan *et al.*, 2019; Ross *et al.*, 2019). As perdas estão associadas a técnicas inadequadas de manuseio, estradas com más condições (Pretorius e Steyn, 2019), embalagens inadequadas (Sibomana *et al.*, 2019; Fernando *et al.*, 2019) e falta de refrigeração (Kitinoja *et al.*, 2019). Esses fatores contribuem com o aumento do número de infecções causadas por patógenos. As perdas econômicas devido a infecção fúngica em frutas podem chegar a 50% (Youssef e Hussien, 2020).

Os fungos têm a capacidade de infectar uma ampla gama de frutas e vegetais (Romanazzi e Feliziani, 2016). As principais perdas de frutas na pós-colheita são devidas a patógenos fúngicos, como: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Colletotrichum* e *Rhizopus* (Ahmed *et al.*, 2017). Durante o armazenamento pós-colheita de frutas cítricas, o *Penicillium digitatum* e o *Geotrichum* spp. são os fungos que causam maiores perdas econômicas (Chen *et al.*, 2019), porém o *Geotrichum* spp. vêm sendo frequentemente relatado devido a sua resistência aos fungicidas (Zhao *et al.*, 2020). O *Penicillium Italicum*, o *Penicillium ulaiense*, o *Rhizopus stolonifer* e a podridão de *Mucor piriformis* são patógenos menos frequentes em *Citrus*. O *P. ulaiense*, conhecido como mofo bigode foi encontrado pela primeira vez na Califórnia, sendo semelhante ao *P. Italicum*, principalmente pela tonalidade da colônia, embora o *P. Italicum* seja cinco vezes mais virulento. A diferença entre o *R. stolonifer* e o *M. piriformis* é que o primeiro não se desenvolve em temperaturas inferiores a 5°C, ao contrário do *M. piriformis*, que cresce, embora lentamente, em temperaturas na faixa de 0°C, causando deterioração mesmo em frutas armazenadas a frio (Zacarias *et al.*, 2020).

O impacto da podridão na pós-colheita não se restringe apenas à perda das frutas. Quando há remessas de frutas danificadas na exportação, os importadores rejeitam a carga e cobram do produtor os custos do transporte e incineração da carga. Além disso, podem rejeitar esse produtor e buscar outros no mercado (Zacarias *et al.*, 2020).

4.4. *Geotrichum* spp.

O *Geotrichum* sp. pertence ao filo *Ascomycota*, classe *Saccharomycetes*, ordem *Saccharomycetales* e família *Dipodascaceae*. É classificado como um fungo filamentoso e segundo a revisão taxonômica realizada por Hood e Smith (2004), apresenta 22 espécies (Lechner *et al.*, 2011).

A reprodução do fungo é mista, podendo ser sexuada ou assexuada. A fase sexual é chamada de telemórfica e a assexual de anamórfica. Na reprodução sexuada o fungo produz ascos que contém os ascósporos (esporos sexuais) produzidos por meiose (divisão celular). Na fase assexual o principal meio de reprodução é através da fragmentação da hifa, ou seja, as hifas septadas se ramificam e fragmentam em arthroconídios, que são pequenos segmentos em formato retangular ou elipsoidal. Segundo McDonald e Linde (2002), os patógenos que possuem a capacidade de se reproduzir sexuada ou assexuadamente são mais propensos à seleção de raças resistentes aos fungicidas.

O *Geotrichum citri-aurantii*, e o *Geotrichum candidum*, agentes causais da podridão azeda, são espécies associadas a pós-colheita de frutas e hortaliças (Paes, 2016). O *G. citri-aurantii* foi descrito pela primeira vez por Smith (1917) em limões sendo responsável por grandes prejuízos principalmente em frutas cítricas (Klein e Kupper, 2018; Gusella *et al.*, 2021). O *G. candidum* é muito utilizado na maturação de queijos (Ratray e Eppert, 2021) e está presente em diversos hospedeiros, causando doenças pós-colheita em: morango Hussain *et al.*, 2016; Alonzo *et al.*; 2020; Ma *et al.* 2017), pêssego (Alm *et al.*, 2017), kiwi (Cheng *et al.*, 2021), melão (Halfeld-Vieira *et al.*, 2020), beterraba (Khan *et al.*, 2019), cenoura (Horitta e Hatta, 2015) e alguns trabalhos citam a existência de *G. candidum* em *Citrus* (Wang, W. *et al.*, 2018; Cunha, 2013). O *G. candidum* também é reconhecido como um patógeno humano, podendo causar infecções no trato respiratório de pacientes debilitados com baixa imunidade (Keene *et al.*, 2019).

Embora o *G. citri-aurantii* tenha sido associado a frutas cítricas (Butler *et al.*, 1988), há exceções. Hernández-Montiel *et al.*, 2010 relata o primeiro caso de *G. citri-aurantii* em limões e Nakamura *et al.* (2001) citam a existência de *G. candidum*. Suprpta *et al.* (1995) isolou *G. citri-aurantii* de ambientes não cítricos e McKay *et al.* (2012) isolou *G. candidum* de solo de pomares cítricos. Para a identificação em nível de espécie, são necessários métodos moleculares (McKay *et al.*, 2012). É importante a identificação do *Geotrichum* sp, pois fornece informações importantes para propor um método para controle (Rizwan *et al.*, 2021). O *G. candidum* e *G.*

citri-aurantii podem ser facilmente identificados através da análise em PCR (*Polymerase chain reaction*), usando *primers* específicos para a espécie (McKay *et al.*, 2012).

Ambos os fungos residem no solo, mas são disseminados pela água da chuva, por partículas de solo transportados pelo ar ou por insetos. Eles entram no hospedeiro através de feridas em sua superfície. A parede celular vegetal é uma barreira contra a ação de fitopatógenos, sendo composta por pectina, celulose e outras proteínas. O *Geotrichum* secreta cinco enzimas: poligalacturonase (PG), polimetilgalacturonase (PMG), celulase (Cx), transeeliminase de ácido poligalacturônico (PGTE) e pectinmetiltranseeliminase (PMTE) (Zhao *et al.*, 2020), que degradam a parede celular e modificam o pH do hospedeiro através da indução da acidificação do tecido (Nakamura *et al.*, 2001; Papoutsis *et al.*, 2019).

A faixa de temperatura para o crescimento do fungo é entre 10°C a 40°C. No entanto, o fungo se desenvolve mais rapidamente em ambientes entre 28 a 30°C e com alta umidade (UR acima de 80%) (Baudoim e Eckert, 1982; Thomidis *et al.*, 2021). No cultivo em placas de Petri, a temperatura ótima para germinação de esporos e crescimento micelial é de 25°C (Thomidis *et al.*, 2021). Com o desenvolvimento do sintoma a lesão no tecido afetado se torna mole e à medida que se agrava, a epiderme começa a se dissolver formando um micélio branco na superfície da fruta (Figura 1) (Ladaniya, 2008; Thomidis *et al.*, 2021).

Zhao *et al.* (2020) investigaram os mecanismos de resistência do *G. citri-aurantii* ao fungicida guazatina e encontraram doze genes relacionados a resistência à guazatina.



Figura 1. Laranja ‘Lima’ com sintoma de podridão azeda. A coloração branca é resultado da formação de artroconídios.

Com o advento das mudanças climáticas têm se observado a seleção de patógenos fúngicos termotolerantes e causando doenças em plantas (Nnadi e Carter, 2021; El-Sayed e Kamel, 2020). A *Puccinia striiformis*, agente causal da ferrugem em trigo, antes encontrada somente em áreas frias, está sendo vista também em áreas mais quentes, sendo relatada nos Estados Unidos e Austrália. *Candida auris*, identificada pela primeira vez em 2009, no Japão,

causando infecções em humanos, recentemente está se tornando uma ameaça a saúde pública ao redor do mundo (Du *et al.*, 2020; Forsberg *et al.*, 2019), principalmente devido a sua capacidade de crescer em temperaturas de até 42°C (Kean *et al.*, 2020). Provavelmente o aumento da temperatura global seja um fator que esteja contribuindo para que o *Geotrichum* tenha se tornado um agente causal de doença pós-colheita mais comum em diversas frutas.

4.5. Métodos alternativos para controle de fungos patogênicos

4.5.1. Tratamento com água quente

Em 1887, na Dinamarca, há o primeiro relato da utilização do tratamento hidrotérmico. Descobriu-se que mergulhando sementes de trigo em uma chaleira com água a temperatura entre 43°C e 58°C por até 15 minutos, era possível prevenir o aparecimento do fungo *Puccinia triticina* em sementes de trigo (Trove, 1893). Ao longo dos anos outros pesquisadores observaram que o tratamento hidrotérmico também era eficiente para controle de doenças pós-colheita em frutas. Pennock e Maldonado (1962) descrevem que a imersão de manga em água a 52°C por 15 minutos reduzia danos causados por *Colletotrichum gloeosporioides*. A imersão de mamões em água a 48°C por 20 minutos se mostrou eficiente no controle de *Phytophthora palmivora* (Aragaki, 1981).

Atualmente os três principais sistemas em uso para aplicação de calor para controle de doenças pós-colheita em produtos agrícolas são (Mahajan e Kapoor, 2021): o *Vapor Heat Treatment* (VHT), o *Hot Water Dipping* (HWD) e o *Hot Water Rinsing And Brushing* (HWRB).

No *Vapor Heat Treatment* (VHT) ou tratamento por vapor, as caixas são empilhadas em uma câmara com sistema para liberação de vapor. No entanto, o tratamento hidrotérmico, como a técnica de *Hot Water Dipping* (HWD) ou *Hot Water Rinsing And Brushing* (HWRB), que consiste em submeter o produto em água quente, é um meio preferido para aplicação (Fallik, 2004).

O *Hot Water Dipping* (HWD) ou imersão em água quente é um tratamento térmico onde o produto agrícola é mergulhado em um tanque de aço inox com sistema de circulação e aquecimento da água (Fallik, 2004) por vários segundos (3 a 120 segundos) a horas (até 2 horas). Em seguida é submetido a água fria para cessar o efeito térmico.

O *Hot Water Rinsing And Brushing* (HWRB) ou lavagem e escovação com água quente é um método rápido de limpeza e desinfecção de produtos frescos em alta temperatura (55 a 70°C) em um curto período de tempo (até 60 segundos). No final do tratamento as frutas eram

submetidas a água fria para cessar o efeito térmico, seguido de um túnel com ventilação de ar. (Fallik *et al.*, 2021).

Tanto o HWD quanto o HWRB são alternativas eficientes no controle de patógenos e na manutenção da qualidade do produto. O tratamento com água quente por imersão a 55°C por 30 segundos em maçãs, reduziu em 100 a 1000 vezes a quantidade de microrganismos da epiderme da fruta evitando danos ao seu tecido (Kabelitz e Hassenberg, 2018). Terao *et al.* (2021) avaliaram o uso do HWD a 52 ° C por 2 minutos e HWRB a 65 ° C por 15 segundos e observou que ambos controlaram de forma eficiente a podridão por *Fusarium pallidorozeum* em melão ‘Galia’.

Além do tratamento com água quente controlar os esporos de fungos que ficam na superfície ou nas primeiras camadas da epiderme da fruta, também redistribui a cera natural da superfície do produto, selando as microlesões e impedindo a entrada desses microrganismos. Ao analisar através da microscopia por varredura melões tratados a 59°C por 15 segundos em HWRB, Fallik (2001) observou que as frutas estavam livres de poeiras, esporos e todas as aberturas naturais da epiderme da fruta totalmente seladas. Resultados semelhantes também foram obtidos com laranjas 'Shamouti' submetidas ao tratamento com HWD a 56 ° C por 20 segundos (Porat *et al.*, 2000). No entanto, a eficácia do tratamento no controle de microrganismos irá depender da temperatura de aquecimento, tempo de exposição e da resistência ao calor dos microrganismos (Besten *et al.*, 2018), sendo que a temperatura e o tempo de exposição em água dependem do tamanho da fruta, da maturidade e da cultivar (Fallik, 2004).

Esta técnica também é benéfica em termos de manter a qualidade do produto. Abóboras (*Cucurbita pepo* L.) tratadas com HWRB a 54 ° C por 15 segundos apresentaram aumento na firmeza e aumento no período de armazenamento, de 3 para 5 meses em comparação com abóboras não tratadas (Chalupowicz *et al.*, 2018). Pepinos (*Cucumis sativus* L) foram imersos em água quente a 45°C e 55°C por 5 minutos e mantidos a 4°C por 7, 14 e 21 dias e em seguida em prateleira a 20°C por 2 e 4 dias. Os resultados mostraram que pepinos tratados a 55°C por 5 minutos apresentaram menor perda de peso, menor injúria pelo frio, além de melhor aparência, cor e sabor durante o armazenamento (Nasef, 2018).

O tratamento hidrotérmico também traz benefícios para as frutas cítricas. Laranjas ‘Navelate’ submetidas a HWD a 53°C por 3 minutos apresentaram menor incidência de podridão sem afetar os parâmetros de qualidade, como: pH, sólidos solúveis e acidez total

titulável (Garcia *et al.*, 2016). Tangerinas ‘Satsuma’ tratadas por imersão em água quente a 60°C por 20 segundos também não apresentaram efeitos adversos nos mesmos atributos de qualidade, além disso o tratamento melhorou a aparência das frutas, tornando-as mais limpas e brilhantes. A imersão de laranjas ‘Valência’ a 50°C por 5 minutos reduziu a taxa respiratória, preveniu a perda de peso e controlou os patógenos de *P. digitatum* e *P. Italicum* (Gao *et al.*, 2021). Strano *et al.* (2014) observaram a redução na incidência de *P. digitatum* em laranjas ‘Tarocco’ (*Citrus senensis L. Osbeck*), quando submetidas ao tratamento HWD 56°C por 20 segundos sem influenciar a qualidade interna e externa. E o tratamento térmico a 55°C por 20 segundos foi eficaz em prolongar a vida de armazenamento da fruta ‘Ponkan’ (Tang, *et al.*, 2017).

4.5.2. Radiação ultravioleta C para controle de doenças pós-colheita

Os raios ultravioletas são ondas eletromagnéticas emitidas naturalmente pelo Sol ou artificialmente por lâmpadas especiais (Wilson *et al.*, 2012; Rastogi *et al.*, 2010). As ondas eletromagnéticas ou também chamadas de radiação, são classificadas de acordo com seu comprimento de onda e o conjunto dessas radiações são chamados de espectro eletromagnético. A Figura 2 representa um espectro eletromagnético, onde a luz visível é o único intervalo do espectro eletromagnético que pode ser visto pelo olho humano. Do lado direito do espectro visível encontram-se os tipos de radiação com maior comprimento de onda, onde incluem as ondas de rádio, micro-ondas e infravermelho. A radiação infravermelha é utilizada em sensores de estacionamento e em câmeras de detecção térmica. As ondas de rádio têm os maiores comprimentos de onda, sendo utilizados para transmitir sinais de televisão, rádio e celular. E o micro-ondas em roteadores *wi-fi*, radares e no aquecimento dos alimentos. Já ao lado esquerdo encontram-se os tipos de radiação com maior energia, como os raios gama, x e ultravioleta. Os raios gama são uma forma de radiação de alta frequência produzida em fenômenos astronômicos, como erupções solares e o raio x é amplamente utilizado em exames de radiografia. O ultravioleta possui comprimento de onda menor que 400 nm, sendo que a camada de ozônio presente na atmosfera absorve grande parte da radiação emitida pelo Sol, embora a existência de buracos na camada de ozônio venha causando um sério risco para todos.

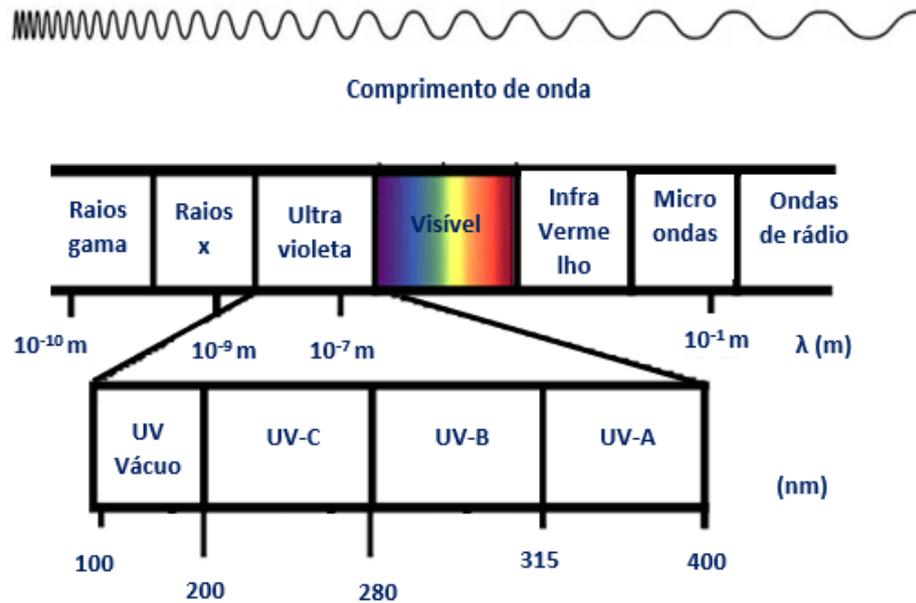


Figura 2. Espectro eletromagnético (Adaptado de UFRGS, 2022)

Existem quatro tipos de radiação: o UV-A (com comprimento de onda de 315 a 400 nm); o UV-B, (com comprimento de onda de 280 a 315 nm); o UV-C (com comprimento de onda de 200 a 280 nm) e o UV vácuo (com comprimento de onda de 100 a 200 nm) (Delorme *et al.*, 2020; Darré *et al.*, 2022). A radiação UV-A e UV-B atingem a superfície terrestre e o UV-C é filtrado na estratosfera pela camada de ozônio. Para estudar o impacto dessas radiações em sistemas biológicos, ele deve ser gerado artificialmente por lâmpadas. A denominação de ultravioleta a vácuo deve-se à necessidade de se operar em baixos comprimentos de onda, removendo através de um aparelho a vácuo o O_2 atmosférico (Cavicchioli e Gutz, 2003), sendo utilizado em espectroscopia e fotoquímica.

Dentre os tipos de radiação mencionados, a radiação ultravioleta C (UV-C) na faixa entre 250 a 260 nm é a mais letal, devido ao seu efeito germicida em diferentes microrganismos, como fungos, bactérias e vírus (Fallik e Elic, 2022; González-Estrada *et al.*, 2021). Através de lâmpadas, é aplicada na esterilização de objetos, no tratamento de água e tem se destacado também nos tratamentos pós-colheita de frutas e vegetais (Pathak *et al.*, 2018; Imaizumi *et al.*, 2018). O tratamento com radiação UV-C é um método não térmico, seguro e que não deixa resíduos (González-Estrada *et al.*, 2021; Hassan *et al.*, 2020). O estudo realizado por Gabriel *et al.* (2017) mostraram que a exposição à radiação UV-C (254 nm) por 40 minutos reduziu a população de *Salmonella enterica* em coco. Baixa dose de radiação ($2,5 \text{ kJ/m}^2$), controlou em 70% a severidade de *Botryosphaeria dothidea* em mangas ‘Tommy’ (Terao, 2014). E a dose de $31,01 \text{ kJ/m}^2$ (16 minutos), reduziu a contagem de bactérias mesofílicas da superfície de

damascos ‘Salak’ (Taze e Unluturk, 2018). A radiação UV-C a 7,5 minutos provou ser capaz de reduzir a carga microbiana de coliformes e leveduras presentes em morangos (Oviedo *et al.*, 2018).

Pistache fresco foi submetido a dose de 2,1 e 4,5 kJ/m² de radiação UV-C em um sistema rotativo com sete lâmpadas e posteriormente acondicionadas em embalagens perfuradas e não perfuradas de PET (Polietileno Tereftalato). A irradiação a 2,1 kJ/m² de produtos embalados em PET não perfurados apresentou redução no crescimento de *Aspergillus flavus*, sem alterações nos parâmetros físico-químicos e sensorial das frutas (Hosseine *et al.*, 2019).

A radiação induz mecanismos de resistência no tecido da planta em resposta a estresse, levando a produção de metabólitos específicos e também de várias proteínas, incluindo enzimas, ao longo do tempo. Para alguns tipos de frutas, como pêssegos, maçãs e tangerinas, os efeitos são sistêmicos e, portanto, não há necessidade de expor toda a superfície da fruta aos raios UV (Shama, 2014).

Quando um produto é irradiado parte da energia é absorvida e faz com que retarde o crescimento de microrganismos presentes nele. Isso porque a radiação ao penetrar na parede celular do microrganismo, danifica seu DNA e impede que o mesmo cresça e se reproduza (Gabriel *et al.*, 2017; Reddy *et al.*, 2018).

No entanto, para ter uma boa eficiência do tratamento é necessário definir a dose de radiação UV-C e o comprimento de onda para cada microrganismo e produto agrícola, visto que eles apresentam diferentes características e sensibilidade à radiação (Delorme *et al.*, 2020). A radiação UV-C apresentou eficiência no controle de *Colletotrichum gloeosporioides* em mamão a dose de 0,5 kJ/m². A epiderme do mamão é sensível a radiação UV-C, portanto recomenda-se a aplicação de radiação UV-C direcionada ao pedúnculo (Terao *et al.*, 2019). A exposição à radiação em excesso também pode afetar negativamente as propriedades físico-químicas, nutricionais e a aparência do alimento (Peña *et al.*, 2019; Delorme *et al.*, 2020).

Usberti e Ferraz (2019) avaliaram o efeito de níveis de radiação UV-C na incidência de doença pós-colheita na aparência e nas propriedades físico-químicas dos figos armazenados a 10°C e 20°C. Observaram que figos expostos a níveis de radiação entre 0,71 e 4,01 kJ/m² armazenados a 20°C apresentaram menor incidência que o tratamento controle. No entanto, figos expostos a doses acima de 4,01 kJ/m² apresentaram manchas e danos, prejudicando sua aparência.

Além do controle de microrganismos, a radiação pode retardar o processo de senescência mantendo as propriedades físico-químicas do produto. Melões ‘Galia’ submetidos a 2 kJ/m² de radiação UV-C apresentaram redução na atividade do patógeno *F. pallidoroseum*, bem como redução na atividade respiratória, resultando em um retardo na senescência (Terao *et al.*, 2021). Pristijono *et al.* (2018) relataram que mangas ‘Tommy’ tratadas com 11,7 kJ/m² de radiação UV-C se mostraram mais firmes em comparação com as não tratadas. A radiação UV-C também foi estudada quanto a eficiência na qualidade de abacaxi ‘Pulae’. A dose de 39,6 kJ/m² reduziu o escurecimento e aumentou o teor de vitamina C na polpa durante o armazenamento (10°C) por 28 dias (Sari *et al.*, 2016). A aplicação da dose de 6 kJ/m² em cereja doce retarda o processo de amadurecimento, manteve a firmeza e reduziu em 14% a taxa de respiração (Michailidis *et al.*, 2019).

O tratamento com UV-C também pode contribuir para que o alimento induza mecanismos de resistência a doença, isso devido ao aumento de chitinase e β-1,3-glucanase, enzimas relacionadas a defesa (Terao *et al.*, 2019). O tempo de exposição a 4,52 minutos reduziu significativamente o desenvolvimento de *P. digitatum* em tangerinas ‘Satsuma’. Além disso, a radiação aumentou a concentração de fenólicos totais, flavonoides totais e a capacidade de sequestro de radicais DPPH (abreviatura do composto químico 2,2-difenil-1-picrilhidrazil), resultando na inibição do bolor verde (Phonyiam *et al.*, 2021). A atividade das enzimas superóxido dismutase, catalase e ascorbato peroxidase e a expressão de genes relacionados à defesa foram maiores em morangos tratados com 2 kJ/m² de UV-C do que no controle (Jin *et al.*, 2017). A irradiação UV-C também degrada a aflatoxina em alimentos, um metabólito secundário tóxico produzido por algumas espécies de fungos, como por exemplo o *Aspergillus* (Diao *et al.*, 2017; Peles *et al.*, 2019). Pankaj *et al.* (2018) apresentaram uma revisão das tecnologias utilizadas para descontaminação de aflatoxinas e a radiação UV-C apresentou resultados promissores. Amendoins submetidos a exposição por 45 minutos tiveram redução em 96% da presença da micotoxina (Mao *et al.*, 2016) e em figo a exposição por 90 minutos reduziu em 25% a presença da micotoxina (Ysman e Biyik, 2009).

4.5.3. Tratamentos combinados para controle de doenças fúngicas pós-colheita

Os tratamentos combinados envolvendo várias tecnologias podem proporcionar a inibição sinérgica ao crescimento de microrganismos, sem alterar a qualidade do produto. O tratamento hidrotérmico pode ser utilizado sozinho ou combinado com outro tratamento. Laranjas ‘Pêra’ submetidas ao tratamento HWD a 55°C por 30 segundos e dose de 2 kJ/m² de

radiação UV-C apresentaram baixa severidade da doença durante 15 dias de armazenamento (Terao *et al.*, 2017). E mangas tratadas com HWRB a 65°C por 15 segundos, seguida da radiação UV-C a 2,5 kJ/m² mostrou controle de *B. dothidea* após 18 dias de armazenamento (Terao *et al.*, 2018).

5. CAPÍTULO I: COLETA, ISOLAMENTO, TESTES PRELIMINARES E IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DO AGENTE CAUSAL DA PODRIDÃO AZEDA EM LARANJA ‘LIMA’

5.1 RESUMO

O isolamento do microrganismo associado ao sintoma da podridão azeda foi realizado a partir de amostras de laranjas ‘Lima’ sintomáticas coletadas no *packing-house* do produtor na cidade de Engenheiro Coelho, SP. O fungo foi cultivado em meio batata dextrose ágar (BDA) e incubado a 25°C por 7 dias. A partir da colônia repicada realizou-se a identificação em nível de gênero através das características morfológicas, com a observação da presença de artroconídios. A colônia apresentava coloração branca a creme, com superfície pulverulenta e odor adocicado. As hifas eram septadas e articulavam-se em artroconídios que tinham formato retangular ou elipsoidal, medindo entre 2-11µm. Com base nas características morfológicas, o fungo foi identificado como *Geotrichum* sp. Para identificação molecular específica do isolado, as regiões ITS, SSU e LSU foram amplificadas utilizando os *primers* ITS4/ITS5, NS1/NS4 e LROR/LR5. A análise BLAST revelou similaridade acima de 90% com sequências de referência do *Geotrichum citri-aurantii* para ITS (MH153586), LSU (JN974284) e SSU (AB000664). Sequências de *Geotrichum* spp. obtidas do Genbank foram utilizadas para construção da árvore filogenética *multilocus* pelo método da máxima parcimônia, implementadas no software MEGA 11. Os isolados foram agrupados dentro do clado *G. citri-aurantii*. O patógeno foi depositado na Coleção de Microrganismos de Importância Ambiental e Agrícola (CMAA), em Jaguariúna, São Paulo, Brasil, com numeração CMAA-1841. Antes da inoculação das laranjas foram realizados testes preliminares e determinou-se que a concentração de suspensão de esporos 1×10^6 , armazenamento a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ em $70 \pm 2\%$ de umidade relativa por 4 horas são os melhores parâmetros para o desenvolvimento de sintomas de podridão azeda em laranja ‘Lima’.

Palavras-chave: artroconídios, *Geotrichum citri-aurantii*, *Citrus sinensis* L. Osbeck var. *Lima*

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Microbiologia (LMA) da Embrapa Meio Ambiente, em Jaguariúna, SP.

As laranjas ‘Lima’ utilizadas neste projeto, assim como as amostras de laranjas sintomáticas foram adquiridas na Alfacitrus Produção e Comércio de Cítricos, em Engenheiro Coelho, São Paulo, Brasil.

5.2.1. Coleta da amostra e isolamento do agente causal

As amostras de laranja ‘Lima’ sintomáticas foram coletadas no *packing-house* do produtor e encaminhadas ao laboratório LMA da Embrapa Meio Ambiente, em Jaguariúna, SP.

Para o isolamento do patógeno, realizou-se a técnica do isolamento indireto, que é indicada para organismos que estejam esporulando em material infectado (Alfenas *et al.*, 2007). O procedimento para realização do isolamento foi realizado de acordo com as recomendações de Menezes e Assis (2004).

Com um bisturi estéril, pequenos fragmentos (aproximadamente 5x5mm) foram retirados da região de transição da lesão (entre o tecido sadio e o doente) da fruta, desinfetadas em álcool 70% por 1 minuto e posteriormente hipoclorito de sódio na concentração 3:1 por mais 1 minuto. Em seguida, foram enxaguados com água destilada e colocados sob papel filtro esterilizados. Efetuou-se o plaqueamento dos fragmentos em meio de cultura batata dextrose ágar (BDA), de uma maneira que eles ficassem equidistantes. As placas foram vedadas com parafilme e incubadas e mantidas em uma sala climatizada a temperatura de $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ iluminada com luz natural (sem controle de fotoperíodo), por 3 dias. Após o crescimento da colônia, para se obter uma cultura pura, foi retirado um fragmento da colônia do fungo, transferindo-se para outras placas com meio de cultura BDA, que foram incubadas nas mesmas condições, na temperatura de 23°C . Após o crescimento, o isolado foi utilizado na etapa dos testes preliminares, no teste de patogenicidade e na identificação morfológica.

5.2.2. Testes preliminares

Foram realizados testes preliminares para determinar a concentração adequada de suspensão de artroconídios para inoculação das laranjas ‘Lima’, o melhor objeto para realizar o ferimento, o tempo de incubação antes de submeter as frutas aos tratamentos, assim como as melhores condições para armazenamento para o aparecimento dos sintomas da doença.

5.2.2.1. Teste 1 - Concentração da suspensão, objeto para fermento da fruta e período de incubação em câmara úmida

Neste teste avaliou-se:

- **Suspensão de artroconídios nas concentrações:** 1×10^5 , 1×10^6 (Smilanick, 2003) e 1×10^7 artroconídios/mL (Martínez-Blay *et al.*, 2020; Soto-Muñoz *et al.*, 2021; Chen *et al.*, 2021).
- **Objeto para fermento:** A) prego com 2 x 1 mm (largura x profundidade); B) agulha de aço com 1 x 2 mm e C) agulha com 0,5 x 1 mm, conforme Figura 3.
- **Período de incubação em câmara úmida:** 4, 6, 8 e 15 horas

Câmara úmida: constituído de uma caixa de polipropileno (38 x 27 x 12cm) forrada com papel toalha e umedecida com água destilada estéril.

O procedimento para preparo das frutas, suspensão de esporos e inoculação estão descritos nos parágrafos seguintes.

Preparo das frutas: Laranjas ‘Lima’ foram trazidas do produtor e padronizadas quanto ao tamanho, maturação, sanidade e ausência de danos mecânicos. As frutas não haviam sido submetidas a tratamento pós-colheita e eram utilizadas em laboratório imediatamente. A desinfestação superficial foi feita com hipoclorito de sódio a 0,1% por 1 minuto (Terao *et al.*, 2017), e em seguida enxaguadas em água de torneira e deixadas para secar sob papel toalha ao ar ambiente (Soto-Muñoz *et al.*, 2020).

Preparo da suspensão: Para o preparo da suspensão foi utilizada uma placa de Petri com o isolado cultivado em meio BDA por 7 dias a $23 \pm 2^\circ\text{C}$. Adicionou-se na placa, com auxílio de uma micropipeta automática Jencons (1-5 mL, Jencons, Finlândia) 9 mL de água destilada estéril e espalhada sobre a colônia fúngica com uma alça de Drigalski. A suspensão obtida foi filtrada através de duas camadas de gaze estéril (Smilanick *et al.*, 2008), a sua concentração foi medida com auxílio de um Hemacitômetro (Câmara de Neubauer) e ajustado nas concentrações mencionadas.

Inoculação artificial do agente causal nas laranjas ‘Lima’: No interior da câmara úmida, conforme descrita anteriormente, foram colocadas placas de Petri (60 x 55mm) a uma distância de 3 cm uma das outras, sobre as quais foram acomodadas as laranjas inoculadas.

As laranjas ‘Lima’ desinfectadas e secas foram feridas na região equatorial utilizando-se cada um dos três objetos mencionados a uma distância de 1,5 cm entre os ferimentos. A profundidade do ferimento foi padronizada com auxílio de um objeto conhecido (Figura 3).

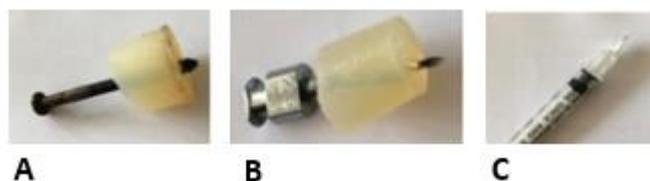


Figura 3. Objetos utilizados para realizar o teste de ferimento nas laranjas ‘Lima’: A) prego com 2 x 1 mm (largura x profundidade); B) agulha de aço com 1 x 2 mm e C) agulha com 0,5 x 1 mm

Adicionou-se sobre o ferimento, com o auxílio de uma micropipeta automática Capp (Ecopipette, 1-20 μL , Capp, Alemanha) uma alíquota de 10 μL de suspensão de artroconídios/mL. Em cada caixa foram depositadas 9 laranjas, cada uma ferida com os três objetos citados, sendo três inoculadas com a suspensão de concentração 1×10^5 artroconídios/mL, três com a suspensão de concentração 1×10^6 e três com a suspensão com a concentração 1×10^7 artroconídios/mL. Após a inoculação, as caixas foram tampadas e levadas a sala climatizada com temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$, reproduzindo um ambiente de câmara úmida, onde permaneceram em incubação por diferentes períodos de tempo (4, 6, 8 e 15 horas). Após o tempo de incubação, as caixas foram abertas e mantidas nas mesmas condições a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ e $70 \pm 2\%$ de umidade relativa. Realizou-se esse teste em duplicata.

Esse experimento foi repetido três vezes, sendo que no segundo ensaio adicionou-se à suspensão do inóculo 10% do volume de suco fresco peneirado da fruta e 0,005 g/L do antibiótico Ciclohexamida para retardar a cicatrização da fruta (Smilanick *et al.*, 2003, 2008; Chen *et al.*, 2021). No terceiro ensaio pulverizou-se a epiderme das frutas com água destilada estéril.

Temperatura e umidade relativa (UR): Para reproduzir as condições de armazenamento de $28 \pm 2^\circ\text{C}$ e $70 \pm 2\%$ de umidade relativa descritos na literatura (Soto-Muñoz, *et al.* 2021; Smilanick, 2003; Smilanick 2008; Soto-Muñoz, Taberner e Palou, 2021) armazenou-se as frutas em sala climatizada, com controle de temperatura e UR, conforme Figura 4. Um sistema de aquecimento (1) e resfriamento (2) trabalhavam em conjunto para manter a temperatura de

28°C±2°C. Para manter o ambiente com alta umidade, utilizou-se um umidificador (3) (Figura 5 B) Waterclear (Soniclear Indústria Comércio Importação e Exportação LTDA, São Paulo, Brasil), ajustado com alta nebulização durante o período diurno e baixa nebulização à noite (para que o equipamento permanecesse abastecido durante todo o período noturno, mantendo a umidade do ambiente controlada). No interior na sala climatizada (Figura 4) havia um sensor que realizava a medição da temperatura, ao qual era apresentada no painel externo da sala climatizada. A medição da umidade foi realizada com o equipamento Termo-Higrômetro Incoterm (Incoterm, Rio Grande do Sul, Brasil).



Figura 4. Sala climatizada, localizada no setor de Campos Experimentais na Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP utilizada para armazenamento das laranjas ‘Lima’.

5.2.3. Teste de patogenicidade

Para confirmar a patogenicidade do isolado, realizou-se os postulados de Koch (1881), seguindo-se as seguintes etapas: 1) o patógeno deve estar associado com a planta doente; 2) o patógeno deve ser isolado; 3) o microrganismo deve ser inoculado em uma planta que esteja sadia; 4) o microrganismo deve ser novamente isolado. Neste trabalho o patógeno foi isolado em meio de cultura BDA.

Laranjas 'Lima' sadias, já previamente higienizadas, foram inoculadas com 10 µL da suspensão de 1×10^6 arthroconídios/mL e outras não inoculadas foram utilizadas como controle. Após inoculadas, as frutas foram mantidas em câmara úmida por 4 horas, em ambiente climatizado a $28 \pm 2^\circ\text{C}$. Após o tempo de incubação, as caixas foram abertas e as frutas foram observadas diariamente até que manifestassem o sintoma semelhante da amostra sintomática trazida do produtor. Utilizaram-se 10 frutas inoculadas e outras 10 como testemunha. Para cumprir o Postulado de Koch, o patógeno foi reisolado da fruta inoculada artificialmente para o meio de cultura (Fernandez, 1993).

5.2.4 Identificação das características morfológicas do fungo

A identificação morfológica foi realizada através das características macroscópicas e microscópicas do fungo, utilizando-se como referência o livro Barnett e Hunter (1972). Para a realização da observação macroscópica observou-se durante o crescimento do isolado as seguintes características da colônia: cor, textura, odor e tamanho. Na identificação morfológica em nível microscópico adotou-se o método da microcultura, para visualizar em detalhe a estrutura reprodutiva do patógeno e ajudar na distinção em nível de gênero (Menezes e Assis, 2004).

Microcultura: Em uma placa de Petri foi colocado um disco de papel filtro e sobre estes três palitos de madeira (Figura 5). Depositou-se sobre o papel filtro duas lamínulas e uma lâmina foi colocada sobre os palitos. Este material foi autoclavado por 20 minutos. Em uma placa de Petri estéril verteu-se uma camada fina de meio de cultura BDA. Após a sua solidificação, segmentou-se, com auxílio de um bisturi estéril, o meio de cultura em quadrados (2cm^2). Os quadrados foram colocados sobre a lâmina do kit e pequenos fragmentos retirados da borda da colônia do isolado em crescimento ativo, foram depositados nos vértices do quadrado, sobre o qual foi colocado a lamínula, com auxílio de uma pinça estéril. O papel filtro foi umedecido com água destilada estéril. A placa foi vedada com parafilme e incubada a temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$ com luz natural (sem controle de fotoperíodo) por 2 dias. Após esse período de incubação, a lamínula foi retirada com auxílio de uma pinça estéril e colocada sobre uma lâmina contendo uma gota de glicerina e uma de água destilada. As laterais da lamínula foram vedadas e observadas no microscópio.

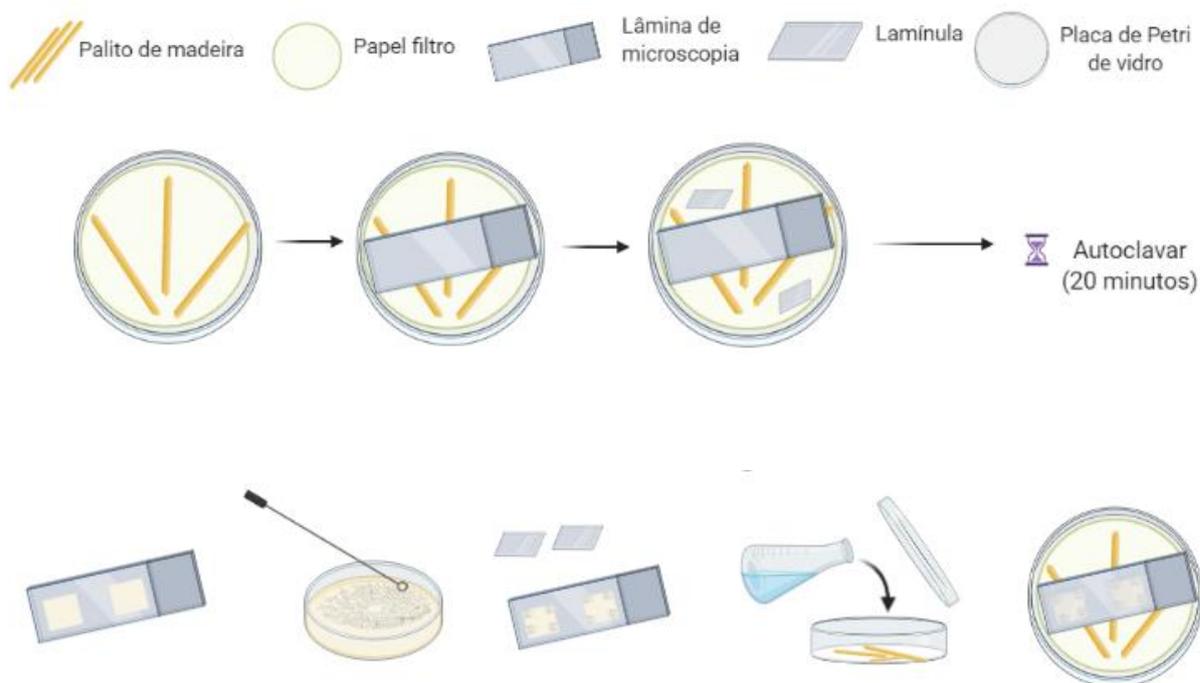


Figura 5. Preparo da microcultura. Desenho esquemático criado com BioRender (<https://biorender.com/>)

5.2.5 Identificação molecular

Para a realização da etapa da identificação molecular utilizou-se uma placa com a colônia monospórica (colônia pura, vinda de um único esporo) do agente causal da podridão azeda em laranja ‘Lima’, aos 7 dias de crescimento após a repicagem. O procedimento para realização do isolamento monospórico foi baseado na metodologia descrita por Fernandez (1993).

Isolamento monospórico: Na placa contendo a colônia pura, incubada a $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ e com 7 dias de crescimento após a repicagem, adicionou-se 9 mL de água destilada estéril e retirou-se com auxílio de uma micropipeta automática Jencons uma única gota. Distribuiu-se essa gota com auxílio de uma alça de Drigalski na superfície do meio de cultura BDA. Após a germinação (24 horas), cortou-se com um bisturi estéril um pequeno quadrado do meio de cultura e colocou-o sobre uma lâmina. A lâmina foi analisada no microscópio e ao localizar o esporo germinado, retirou-o com uma agulha, transferindo-o para uma placa de Petri com meio BDA para a incubação que ficou alojada em uma sala climatizada a temperatura de $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ com luz natural (sem controle de fotoperíodo) por 7 dias.

O procedimento da identificação molecular do patógeno envolveu as seguintes etapas (Figura 6): extração, purificação, amplificação, purificação do PCR, quantificação, secagem, sequenciamento e análise das sequências.

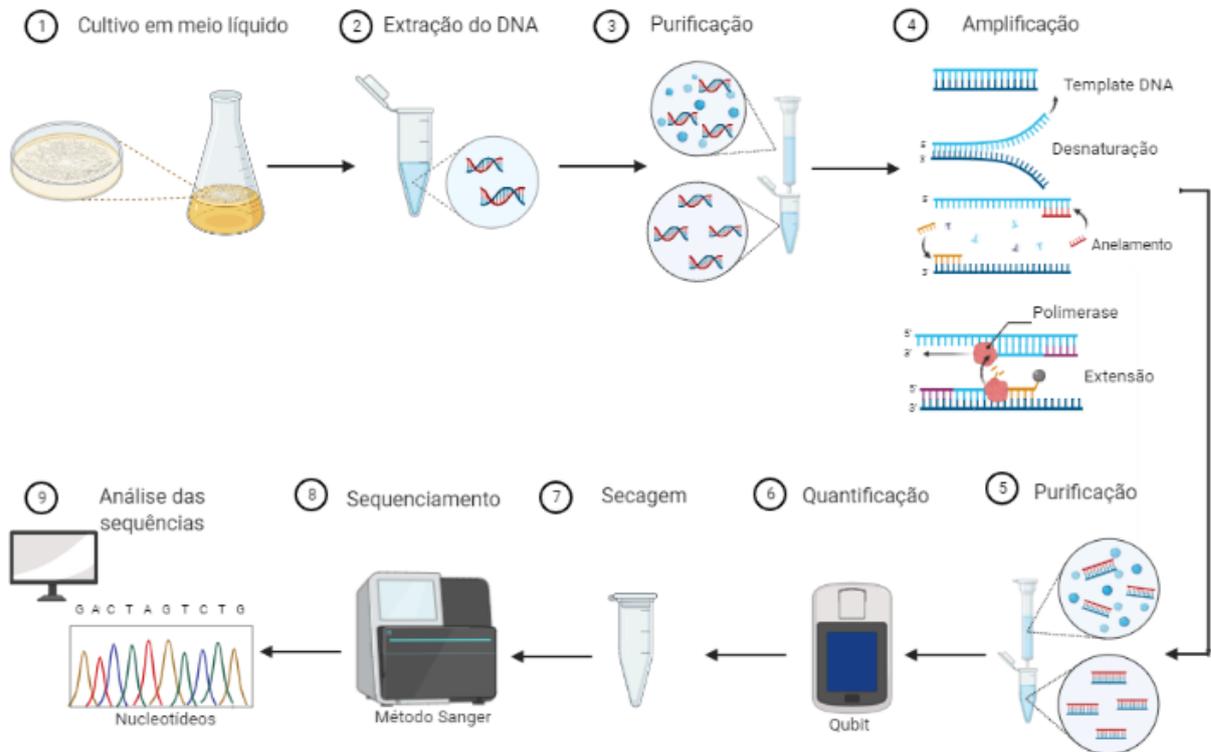


Figura 6.. Etapas do processo de identificação molecular. Desenho esquemático criado com BioRender (<https://biorender.com/>)

Extração do DNA: A extração do DNA envolve as seguintes etapas: rompimento da parede celular, remoção da proteína e precipitação do DNA. Para facilitar a separação do micélio do meio de cultura realizou-se o cultivo do fungo em meio líquido, conforme a metodologia descrita por Brandão *et al.* (2019).

Cultivo em meio líquido: Após o período de incubação, com auxílio de um canudo estéril, repicou-se cinco discos de micélio da borda da colônia e colocou-os dentro de um Erlenmeyer (250 mL) contendo 100 mL de meio de cultura caldo batata dextrose (BD) já previamente esterilizado. Repetiu-se esse procedimento para mais três frascos. Os frascos de Erlenmeyers foram fechados com um tampão de gaze esterilizado e os frascos foram incubados em uma sala climatizada a temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$ com luz natural (sem controle de fotoperíodo) por 7 dias. Para separar a massa micelial do meio de cultura utilizou-se a técnica da filtração a vácuo. Colocou-se um funil Buchner de porcelana (200 mL) forrado com um papel filtro (ambos

esterilizados) sobre um Kitasato estéril (250 mL). Ao frasco conectou-se uma bomba a vácuo (modelo CA, Famem, São Paulo, Brasil) e para garantir a completa vedação, colocou-se uma rolha de borracha entre a vidraria e o utensílio de porcelana. Depositou-se lentamente (sem agitar) o meio líquido com a colônia ao funil e ligou a bomba. Após observar que a massa micelial ficou retida no filtro e todo o líquido depositou-se no fundo do Kitasato, desligou-se a bomba, retirou o papel filtro com uma pinça flambada e depositou-o sobre uma folha de papel alumínio, ao qual foi dobrado e armazenada em freezer a -20°C até o momento da extração (armazenou-se por 1 dia).

Para a extração do DNA genômico do patógeno fúngico utilizou-se o kit DNeasy Ultraclean Microbial Qiagen (Qiagen, EUA). Com o objetivo de romper a parede celular e a membrana citoplasmática da célula fúngica e expor os ácidos nucleicos, realizou-se a maceração da amostra, conforme descrito por Doyle (1991). Retirou-se a massa micelial do papel filtro, foi depositada em um cadinho de porcelana e macerada com nitrogênio líquido. Transferiu-se 1g do pó micelial para um microtubo (1,5 mL) e adicionou-se 1 mL de tampão CTAB (Brometo de Cetil-Trimetil- Amônio, concentração 5%). Agitou-se em vórtex (Labor Import) por 10 minutos e foi incubada em banho a seco Termobloco (Accublock, Labnet International Inc) a 70°C por 20 minutos.

Purificação do DNA: Na etapa de purificação, o ácido nucleico foi separado de proteínas e outros componentes celulares. Para isso, com auxílio da micropipeta Transferpette (20-200 μL , Transferpette, Alemanha), transferiu-se toda a amostra do microtubo para um tubo de coluna (MB Spin Column). Centrifugou-se a amostra na microcentrífuga Eppendorf (modelo 5430 R, Eppendorf, Alemanha) a 14.000 rpm (rotações por minuto) durante 2 minutos e então removeu-se o sobrenadante com auxílio da micropipeta (2-20 μL , Ecopipette). Adicionou-se na coluna 50 μL de solução SL (Solution Lysis) e levou-se ao vórtex por 10 minutos. Centrifugou-se os tubos a 14.000 rpm por 30 segundos. Transferiu-se o sobrenadante para um tubo limpo (2 mL), adicionou-se 100 μL de solução IRS (Inhibitor Removal Solution) e levou-o ao vórtex por 5 segundos. Os tubos foram colocados em um isopor com gelo ($\pm 4^{\circ}\text{C}$) por 5 minutos e depois centrifugou-se novamente (14.000 rpm) por 1 minuto. Transferiu-se o sobrenadante para um tubo limpo (2 mL), adicionou-se 900 μL de solução SB (Solution Bind) e levou novamente ao vórtex por 5 segundos. Centrifugou-se a amostra (14.000 rpm) por 30 segundos. Descartou-se o sobrenadante que ficou retido no tubo inferior da coluna e centrifugou-se novamente (14.000 rpm) por 30 segundos. Adicionou-se 300 μL de Solução CB (Cleaning Solution) e centrifugou-se por 30 segundos. A coluna foi colocada em um novo tubo 2 (mL), adicionou-se dentro da

coluna 50 µL de Solução EB (Elution Buffer) e centrifugou-se novamente a 14.000 rpm por segundos, conforme descrito anteriormente. Descartou-se a coluna e armazenou-se o microtubo com a amostra em freezer a -20°C para posterior quantificação. Ao material extraído chamou-o de DNA molde.

Determinação da quantidade e qualidade do DNA: Através do equipamento Nanodrop espectrofotômetro (modelo ND 2000, Nanodrop Thermo Fisher Scientific, EUA), observou-se a pureza do DNA que foi extraído. Antes da medição calibrou-se o equipamento adicionando-se 1 µL de água deionizada no pedestal de medição. Vedou-se o equipamento e mediu-se com ajuda do software Nucleid Acid. Assim que o equipamento foi calibrado, limpou-se o pedestal e adicionou-se a amostra. O equipamento mediu a absorbância da luz na amostra e o software apresentou a quantidade de ácido nucleico, proteína e impurezas contidas na amostra.

Amplificação pelo método PCR (Reação em cadeia de polimerase): Nesta etapa amplificou-se (copiou-se) por meio da ligação de combinações de *primers* (pequenos fragmentos de fitas simples sintetizados artificialmente) três diferentes regiões do DNA molde: a região do espaçador transcrito interno (ITS), utilizando a combinação de *primers*: ITS4 (5'-TCCTCCGCT TATTGATATGC-3') + ITS5 (5'-GGA AGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') (Serna-Escolano *et al.*, 2019); a subunidade pequena (SSU) utilizando os *primers* NS1 (5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3') + NS4 (5'-CTTCCGTC AATTCCTTTAAG-3') (Schoch *et al.*, 2012) e a subunidade grande (LSU) com os *primers* LROR (5'-ACCCGCTGAACTTAAGC-3') + LR5 (5'-TCCTGAGGGAACTTCG-3') (Eo *et al.*, 2021). Os *primers* utilizados já haviam sido sintetizados, apenas realizou-se uma solução de trabalho na concentração de 100 µM para poder utilizá-los.

Para a amplificação primeiramente, fez-se uma solução, adicionando-se a um único microtubo (2 mL), os seguintes reagentes: água deionizada (Milli-Q), tampão de amplificação, MgCl₂ (Cloreto de Magnésio), Desoxirribonucleotídeo trifosfato (dNTP), o par de *primers* e a taq polimerase. Considerou-se a quantidade de reagentes para 5 reações, sendo: 2 reações contendo os *primers* ITS4 e ITS5 + DNA molde, 1 reação sem o DNA molde (amostra branco) e 2 reações caso ocorresse algum erro de pipetagem. O cálculo da quantidade de reações foi realizado multiplicando-se em cinco vezes cada valor correspondente a reação 1. A concentração e a quantidade de cada componente estão descritas na Tabela 1. Após a mistura, 25 µL foram transferidos para três microtubos (0,5 mL) e imediatamente adicionou-se em dois microtubos 1 µL do DNA molde (um tubo é a amostra testemunha). Em seguida os tubos foram

colocados dentro do equipamento Termociclador VeritiPro (modelo 96-Well Thermal Cycler, Thermo Fisher Scientific, EUA) e as amostras foram submetidas a três etapas distintas em ciclos repetidos: a desnaturação, (dissociação da fita de DNA molde formando duas fitas simples), anelamento (os *primers* se ligam a fita do DNA) e a extensão (extensão da fita do DNA pela ação da taq polimerase). Após término do processo a amostra ficou mantida em temperatura a 4°C. As condições para a amplificação estão descritas na Tabela 2. Repetiu-se a etapa anterior para os *primers* NS1 e NS4 (região SSU) e LROR e LR5 (região LSU). Ao final da amplificação, as amostras retiradas do termociclador foram mantidas em freezer a temperatura de -20°C.

Tabela 1. Concentração e quantidade para 1 e 5 reações dos reagentes utilizados na etapa da amplificação.

Reagentes	Concentração	Quantidade em μL (para 1 reação)	Quantidade em μL (para 5 reações)
Água deionizada	-	17,35	86,75
Tampão	5x	2,50	12,5
MgCl ₂	25 mM	3,00	15,00
dNTP	10 mM	0,50	2,50
<i>Primer Forward</i>	10 μM	0,25	1,25
<i>Primer Reverse</i>	10 μM	0,25	1,25
Taq polimerase	5 U/ μL	0,15	0,75
DNA molde	-	1,00	5,00
Total		25 μL	125 μL

U= Unidade

Tabela 2. Condições para amplificação da região ITS, SSU e LSU

Região	Nome do <i>primer</i>	Etapas da amplificação do DNA		
		Desnaturação	Anelamento	Extensão
ITS	ITS4 <i>Forward</i>	94°C – 4 minutos	55°C – 45 segundos	72°C – 40 segundos
	ITS5 <i>Reverse</i>	94°C – 30 segundos 35 ciclos		
SSU	NS1 <i>Forward</i>	95°C – 5 minutos	52°C – 30 segundos	72°C – 1 minuto
	NS4 <i>Reverse</i>	94°C – 30 segundos 35 ciclos		
LSU	LROR <i>Forward</i>	94°C – 4 minutos	55°C – 45 segundos	72°C – 40 segundos
	LR5 <i>Reverse</i>	94°C – 30 segundos 35 ciclos		

Após a amplificação da região ITS, LSU e SSU e obter milhões de cópias do DNA molde, analisou-se as amostras amplificadas por eletroforese em gel de agarose a 1%.

Para o preparo do gel, seguiu-se a metodologia descrita por Masoodi *et al.* (2021). Em um Erlenmeyer (250 mL) pesou-se 1g de pó de agarose e adicionou-se 100 mL de tampão TAE. Pesou-se novamente o frasco e anotou-se o valor correspondente. O frasco foi levado ao forno de micro-ondas a 30% da sua potência (modelo MEF41, potência 1000 W, Electrolux S/A, Brasil) por 2 minutos, até que o líquido se tornasse translúcido. Devido a evaporação do tampão durante o aquecimento, pesou-se novamente o Erlenmeyer e completou-se o volume com tampão até um valor próximo ao peso inicial. O frasco foi tampado e permaneceu esfriando na bancada, até que a temperatura chegasse a $\pm 52^{\circ}\text{C}$. Despejou-se a solução na cuba (100 mL) e inseriu-se os pentes (é um objeto para formar os poços de carregamento). Assim que o gel solidificou retirou-se os pentes cuidadosamente e mergulhou-se o gel em tampão TAE contido em um tanque do aparelho de eletroforese, de maneira que os poços a serem carregados ficassem próximos a extremidade do terminal negativo. Com auxílio da micropipeta (0,5-10 μL , Labmate pro) carregou-se cuidadosamente cada poço com a mistura de 3 μL de corante Gel Red® e 1 μL da amostra. O mesmo foi feito com a amostra testemunha. No primeiro e no último poço ao invés das amostras, adicionou-se o marcador de peso molecular (DNA ladder, Promega Corporation), que serviu como referência na análise dos resultados das outras amostras de DNA que migraram. Cobriu-se a superfície do equipamento com uma folha de papel alumínio para evitar a influência da luz durante a reação. Conectou-se a fonte de energia em ambas as laterais do equipamento e ajustou-o a potência de 120W por um tempo de 40 minutos. Com a liberação

da corrente elétrica os fragmentos de DNA das amostras, migraram do polo negativo para positivo e por possuírem peso molecular diferente deslocaram-se por diferentes distâncias, chamadas de bandas. Após o término do processo o equipamento foi desligado e transferiu-se o gel para o transiluminador UV-B Loccus (modelo L-PIX EX, Loccus LTDA, Brasil) para verificar o tamanho das bandas de cada região. As amostras permaneceram armazenadas no freezer a -20°C até a etapa de purificação.

Purificação do PCR: No processo de purificação das amostras de PCR para retirar impurezas, utilizou-se o kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega Corporation). Retirou-se as amostras do freezer e deixou-as descongelar em temperatura ambiente durante alguns minutos. Com auxílio da micropipeta (0,5 - 10 μL , Labmate pro) pipetou-se todo o conteúdo dos dois tubos da amostra de cada região (ITS, LSU e SSU) para um microtubo (0,5 mL) e anotou-se o volume final da amostra. A cada volume de microtubo foi adicionado um volume de Membrane Binding Solution na proporção 1:1 (por exemplo, em 20 μL do produto de PCR de cada amostra adicionou-se 20 μL de Membrane Binding Solution). Inseriu-se um tubo SV Minicolumn (filtro) dentro de um Collection Tube e colocou-se a amostra de PCR dentro da minicoluna. Aguardou-se 1 minuto. Centrifugou-se as amostras em centrífuga a 14.000 rpm por 1 minuto. Descartou-se o que passou pela coluna e inseriu-se a minicoluna em outro Collection tube. Adicionou-se 700 μL de Membrane wash solution e centrifugou-se novamente (14.000 rpm) por 1 minuto. Inseriu-se novamente a minicoluna em um novo collection tube. Adicionou-se 500 μL de membrane wash solution. Centrifugou-se (14.000 rpm) por 5 minutos. Descartou-se o que passou pela minicoluna, e centrifugou-se por mais 1 minuto, porém com a tampa interna da centrífuga aberta. Transferiu-se a minicoluna para um tubo limpo (1,5 mL), adicionou-se 20 μL de nuclease-free water e aguardou-se 1 minuto. Levou-se o tubo novamente a centrífuga (14.000 rpm) por 1 minuto. Descartou-se a minicoluna e armazenou-se o produto de PCR a -20°C . Para verificar a qualidade das amostras, analisou-se novamente em gel de agarose a 1%, seguindo o mesmo procedimento descrito no item anterior.

Quantificação do DNA: Utilizou-se o kit Qubit dsDNA HS Assay (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) para medir a quantidade de DNA contida em cada amostra de PCR. Antes de utilizar o aparelho Qubit, necessitou-se calibrá-lo com dois padrões. Para isso, primeiramente preparou-se uma solução de trabalho pipetando-se em um eppendorf grande (5 mL) 6 μL do Qubit reagente e 1194 μL do tampão Qubit HS. Calculou-se o volume do Qubit reagente e Qubit HS multiplicando-se 1 μL e 199 μL , respectivamente pela quantidade total de amostras e padrão (6 amostras = 2 padrões, 1 erro de pipetagem e 3 amostras – ITS, SSU e NSU). Com a micropipeta

adicionou-se 190 μL da solução de trabalho em dois microtubos (0,5 mL). Em um tubo adicionou-se 10 μL da solução padrão 1 e em outro tubo 10 μL da solução padrão 2 (contidos no kit Qubit). Calibrou-se o equipamento com cada padrão. Para leitura das amostras de PCR adicionou-se em microtubos (0,5 mL) 199 μL da solução trabalho e 1 μL da amostra de PCR. Levou-as ao vórtex por 5 segundos e deixou-as em repouso por 5 minutos. Depois prosseguiu-se com a leitura das amostras no equipamento.

Secagem e sequenciamento das amostras de PCR: após quantificação foi realizado o sequenciamento genético pela empresa ACTGene Análises moleculares. Utilizou-se como método de sequenciamento genético a técnica de Sanger, que determinou a ordem que os nucleotídeos estavam em cada molécula de DNA. Para secagem das amostras, assegurando a sua concentração de nucleotídeos, colocou-as em um concentrador de vácuo Speed Vacuum (Vacuubrand, Inc., EUA) e programou-o nas seguintes condições: temperatura de 40°C por tempo de evaporação de 10 minutos. Após o tempo, verificou-se a completa secagem dos tubos.

Bioinformática: Após o recebimento dos resultados do sequenciamento genético pela empresa especializada, os arquivos foram baixados e alinhados às sequências do genoma de referência de cada cópia, através do software BioEdit (versão 7.2, Tom Hall), gerando as sequências consenso. Os resultados do sequenciamento foram comparados quanto à sua similaridade com outras sequências depositadas no banco de dados Genbank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), através da ferramenta BLAST. Para construção da árvore filogenética, utilizou-se o software MEGA 11 (<https://www.megasoftware.net/>). O primeiro passo foi realizar um banco de dados com as sequências semelhantes às sequências do isolado e realizou-se o *download* das sequências pelo próprio MEGA. No segundo passo realizou-se o alinhamento das sequências através do logaritmo ClustalW (Thompson, Higgins e Gibson, 1994). E no terceiro passo construiu-se a árvore filogenética *multilocus* a partir das sequências alinhadas de duas regiões: ITS e LSU, utilizando-se o método estatístico da máxima parcimônia (Hall, 2013). Para conhecer a estimativa da confiabilidade da árvore realizou-se as análises através do método *bootstrap* com 1000 repetições.

5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1. Testes preliminares

No primeiro teste a umidade da sala climatizada foi de $63\pm 2^\circ\text{C}$, com isso apenas no sétimo dia de armazenamento as laranjas inoculadas com a concentração da suspensão 1×10^6 e 1×10^7 arthroconídios/mL manifestaram sintomas.

Os melhores resultados foram observados quando se armazenou as frutas na sala climatizada e realizou-se nos primeiros dias de armazenamento a pulverização da epiderme da fruta com água. Observou-se que a alta umidade é um fator importante para o desenvolvimento do patógeno. Segundo Baudoin e Eckert (1982), o ambiente com elevada umidade relativa que possibilite o alto teor de umidade na epiderme da fruta favorecem o desenvolvimento da lesão causada por *Geotrichum* spp. Ladaniya (2008) e Thomidis *et al.*, (2021) mencionam que o *Geotrichum* spp. se desenvolve mais rapidamente em temperaturas acima de 28°C e UR acima de 80%. Observou-se que nas concentrações de 1×10^6 e 1×10^7 arthroconídios/mL estudadas, houve aparecimento de sintomas a partir do quinto dia de armazenamento, então optou-se por utilizar a concentração 1×10^6 arthroconídios/mL.

Com relação ao instrumento para fazer o ferimento, a agulha de aço (B) foi mais eficiente. Todas as frutas feridas com a agulha de aço (B) e inoculadas com o patógeno apresentaram sintomas.

Quanto ao período de incubação, Benato *et al.*, (2018) incubaram laranjas ‘Pêra’ inoculadas com *P. digitatum*, 4 horas antes da aplicação do tratamento hidrotérmico e Terao *et al.* (2017) por 6 horas. Nossos resultados demonstraram que o período em câmara úmida por 4 horas foi suficiente e adequado entre a inoculação de *Geotrichum* sp. e o início dos tratamentos.

Observou-se que o patógeno se desenvolveu melhor em laranjas ‘Lima’ com a epiderme da fruta com cor alaranjada, conforme Figura 7. Segundo Soto-Muñoz, *et al.* 2021 e Papoutsis *et al.*, 2019, o desenvolvimento da podridão azeda é mais significativo quanto as frutas estão maduras. Portanto, nos ensaios foram utilizados laranjas nesse estágio de maturação.

A adição de suco e Ciclohexamida na suspensão favoreceu o desenvolvimento do fungo, no entanto, nos ensaios seguintes optou-se por não adicionar o suco da fruta na suspensão, visto que somente ajustando-se os demais parâmetros era suficiente para que a fruta manifestasse sintomas.



Figura 7. Laranjas ‘Lima’ utilizadas nos testes preliminares

5.3.2. Identificação das características morfológicas

Conforme apresentado na Figura 8, a colônia apresentava as seguintes características de crescimento: coloração branca a creme, textura lisa e aparência pulverulenta. Características semelhantes também foram relatadas por Ma *et al.* (2017). Segundo Hoog e Smith (2011), o isolado cultivado em meio de cultura BDA a 25°C, em sete dias tinha faixa de crescimento entre 24 a 64 mm, porém em cada meio de cultura apresenta diferentes velocidades de crescimento. Verificou-se que a colônia com 7 dias de crescimento apresentava diâmetro médio de 29,80 mm (Figura 8).

Em relação às características microscópicas, observou-se hifas septadas que se desarticularam em fragmentos em formato retangular e elipsoidal, chamados artroconídios. As mesmas características foram observadas por Barnett e Hunter (1972). O tamanho dos artroconídios variava de 2 a 11 µm de comprimento, o que confere com a descrição de Cheng *et al.* (2021) e Khan *et al.* (2021).

Com base nas características morfológicas, concluiu-se que o isolado pertencia ao gênero *Geotrichum* sp (Cheng *et al.*, 2021 e Khan *et al.*, 2021).

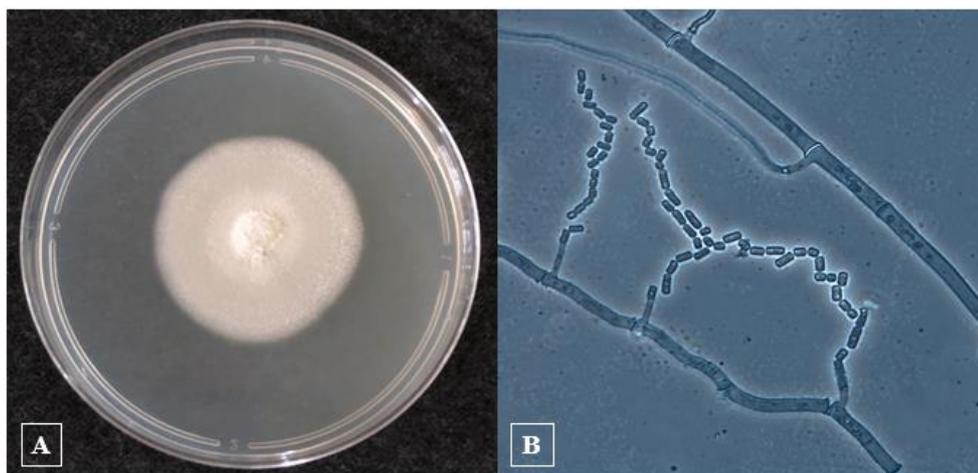


Figura 8. A) Aspecto macroscópico da colônia de *Geotrichum* sp. com 7 dias de crescimento cultivada em meio de cultura batata dextrose ágar (BDA) a $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ com luz natural (sem controle de fotoperíodo) em uma sala climatizada (placa de Petri 90 x 15 mm) e B) estrutura morfológica, com a presença de hifas septadas e formação de artroconídios, observados ao microscópio com aumento de 40 vezes.

5.3.3. Identificação molecular do fungo

Extração e qualidade do DNA

Observou-se no gráfico de comprimento de onda por absorvância gerado pelo software *Nucleic Acid*, um pico em 260 nm, sem a presença de rugosidade, o que indicou a presença de ácido nucleico. Ao observar a relação de absorvância em 260 nm e 280 nm (260/280) e a relação de absorvância em 260 nm e 230 nm (260/230), que são medidas para avaliar a pureza do DNA, obteve-se os valores entre 1,8 nm para 260/280 nm e 2,0 nm para 260/230 nm. A proporção entre 1,8 nm para 260/280 nm e 2,0 nm para 260/230 nm, são aceitas como puras (Nanodrop, 2009), valores diferentes dessa faixa indicam a presença de proteínas e impurezas. Sendo assim, a extração do DNA pela maceração do micélio com nitrogênio líquido mostrou-se eficiente.

Amplificação do DNA nas regiões ITS, LSU E SSU

Na análise em gel de agarose mostraram que houve a amplificação correta da região gênica dos *primers* utilizados, com aproximadamente 326 pb para a região ITS e 1200 pb para as regiões LSU e SSU.

Análise da sequência genética e identificação molecular do fungo

Com base na análise BLAST, a sequência ITS apresentou 99,69% de similaridade com o *Geotrichum citri-aurantii* (nº de acesso no Genbank: MH153586). As sequências LSU e SSU mostraram respectivamente 91,71% (nº acesso no Genbank: JN974284) e 92,49% (nº acesso: AB000664) também para *G. citri-aurantii*.

No Apêndice, Tabela 9.1 apresenta as sequências consenso geradas através do programa BioEdit e que foram utilizadas na elaboração da árvore filogenética. A árvore filogenética *multilocus* foi construída utilizando somente dois *primers* devido à dificuldade em encontrar na literatura trabalhos relacionando os três *primers* propostos (ITS, LSU e SSU), com isso comparou-se os dados do sequenciamento somente das regiões ITS e LSU. A construção da árvore *multilocus* analisando *primers* simultaneamente aumenta a confiabilidade dos resultados (Zhao *et al.*, 2020).

Através da árvore filogenética (Figura 9), é possível confirmar que o isolado em questão pertence a espécie *G. citri-aurantii*, visto que apresenta 100% de similaridade com a cultura TU-GM11 e 99% de similaridade com outros isolados de *G. citri-aurantii*. Observa-se que o isolado está próximo da cepa *G. candidum* (DAOM 216615), talvez por ambas as espécies serem evolutivamente próximas. Resultados similares também foram observados por Zhao *et al.* (2020).

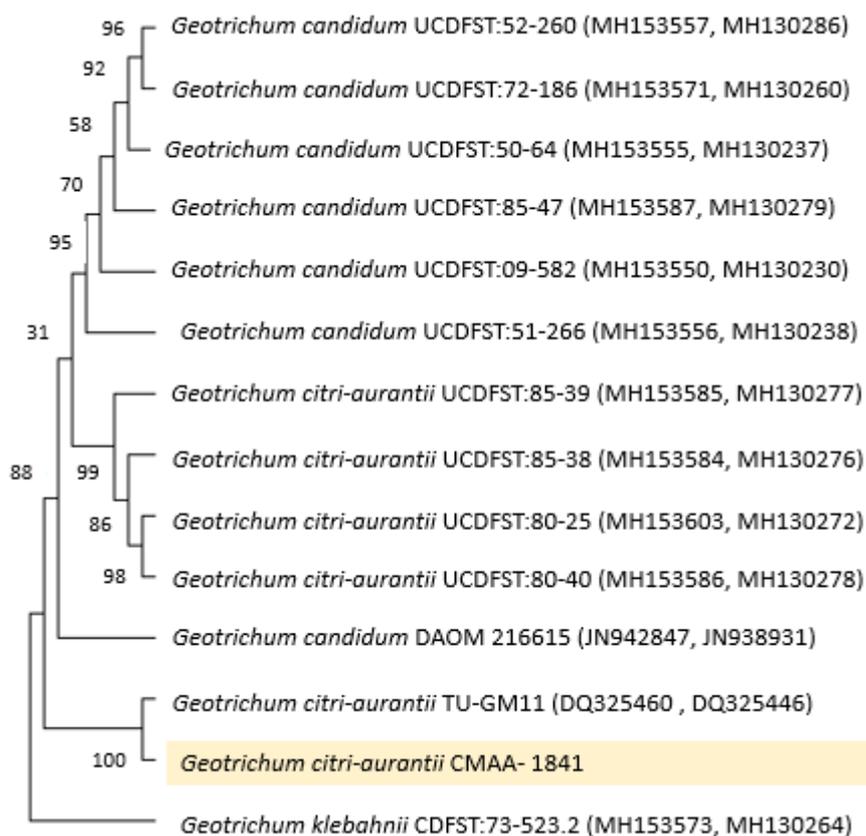


Figura 9. Árvore filogenética *multilocus* gerada a partir do método da máxima parcimônia das sequências ITS e LSU, mostrando a relação do isolado com outras espécies relacionadas. A espécie externa é o *Geotrichum klebahnii*. A identificação ao lado do nome corresponde a cultura e entre parênteses é a numeração de identificação no Genbank.

O isolado identificado foi depositado na Coleção de Microrganismos de Importância Ambiental e Agrícola (CMAA), em Jaguariúna, São Paulo, Brasil, cujo número de acesso é: CMAA-1841.

5.4. CONCLUSÃO

Através dos testes preliminares observou-se que o agente causal da podridão azeda manifesta sintomas em laranjas ‘Lima’ quando está sob condições de temperatura de $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e $70 \pm 2\%$ de umidade relativa. O grau de maturação também favoreceu a infecção. Laranjas com epiderme alaranjada apresentaram sintomas mais facilmente. Determinou-se que a concentração ideal para inoculação é 1×10^6 arthroconídios/mL, com período de incubação de 4 horas.

Os resultados da identificação morfológica indicaram a presença de arthroconídios, característico de espécies de *Geotrichum* sp. E a identificação molecular confirmou através dos *primers* específicos que o patógeno isolado corresponde ao *Geotrichum citri-aurantii*.

6. CAPÍTULO II: ESTUDOS *IN VITRO*: EFEITO DA TEMPERATURA E DA RADIAÇÃO UV-C NO DESENVOLVIMENTO DE *Geotrichum citri-aurantii*.

6.1. RESUMO

Neste projeto foram estudados dois métodos de controle da podridão azeda: tratamento hidrotérmico (HWD) e radiação UV-C. No estudo utilizou-se placas com colônia de *Geotrichum citri-aurantii* com 7 dias de crescimento após a repicagem. O planejamento experimental CCD foi utilizado no experimento da influência da temperatura para otimizar os parâmetros: temperatura e tempo de exposição para obter a melhor resposta. No estudo da inibição da germinação de esporos avaliaram-se os níveis entre 51,9 a 66 °C e tempo de 11 e 45 segundos, e no crescimento micelial através dos níveis 53,8 e 62,2°C e tempo de 15 a 49 segundos. De acordo com a ANOVA, na inibição da germinação de esporos somente a variável temperatura contribuiu significativamente ($p \leq 0,05$) observando-se que o nível adequado de inibição ocorre a partir de 62°C por 35 segundos. No crescimento micelial ambas as variáveis, temperatura e tempo, influenciaram significativamente no desenvolvimento, com inibição a 62°C por 45 segundos, mostrando que os esporos são mais sensíveis à temperatura que o micélio. Para avaliar o efeito da radiação UV-C na germinação de esporos, estudou-se as seguintes doses: 0; 0,01; 0,02; 0,025; 0,05; 0,10; 0,20 e 0,25 kJ/m² e no crescimento micelial utilizou-se as doses: 0; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 kJ/m². A partir dos resultados observou-se que a germinação de esporos de *G. citri-aurantii* foi completamente inibida na dose de 0,10 kJ/m². A radiação UV-C não inibiu o crescimento micelial de *G. citri-aurantii*, nas doses avaliadas, no entanto diminuiu o crescimento da colônia quando comparada a testemunha. Para avaliar o efeito da temperatura combinada com radiação UV-C na germinação de esporos, consideraram-se níveis para a temperatura entre 52,9 a 63°C por tempo de exposição de 12 a 52 segundos; e tempo de exposição em UV-C de 18 a 28 segundos. O nível de exposição térmica por 35 segundos a 62°C combinado com 28 segundos (dose 0,1 kJ/m²) de exposição em radiação UV-C, inibiram completamente a germinação de esporos de *G. citri-aurantii*.

Palavras-chave: tratamento hidrotérmico, radiação UV-C, *Citrus* spp.

6.2. MATERIAL E MÉTODOS

Utilizaram-se colônias do isolado *G. citri-aurantii* em crescimento ativo, cultivadas em meio BDA a $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 7 dias.

Para avaliar o efeito da temperatura e da radiação UV-C na germinação de esporos e crescimento micelial nos ensaios utilizou-se a metodologia descrita por Terao *et al.* (2015, 2019).

6.2.1. Efeito da temperatura no controle de crescimento do fungo

6.2.1.1. Efeito na inibição da germinação de esporos

Em um tubo de ensaio de vidro (13x75mm) foram depositados 100 μL da suspensão de artroconídios de *G.citri-aurantii* (1×10^3 artroconídios/mL) e 900 μL de água destilada estéril. Posteriormente, os tubos foram imersos em banho maria Thoth, com sistema de agitação interno e controle digital de temperatura (Th 220-10, Thoth Equipamentos, Piracicaba, São Paulo, Brasil), já previamente ajustado nas temperaturas e tempos estudados. Após cada tratamento, os tubos foram imersos imediatamente em um recipiente com água a $12\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 1 minuto (para interromper o efeito do aquecimento) (Figura 10). Uma alíquota de 100 μL foi transferida para uma placa de Petri (90x15 mm) com meio de cultura BDA e com auxílio de uma alça de Drigaslsky foi espalhada por toda a superfície do meio. As placas foram vedadas com parafilme e incubadas em sala climatizada com luz natural (sem controle de fotoperíodo) a $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 72 horas.

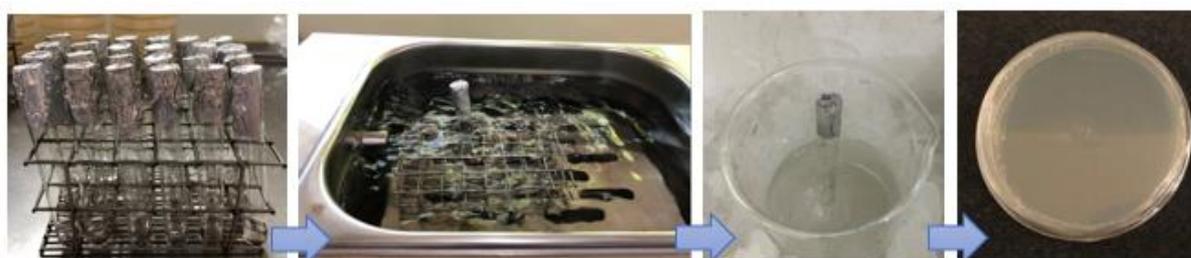


Figura 10. Procedimento para realização do experimento para avaliar o efeito do tratamento hidrotérmico na inibição da germinação de artroconídios do *Geotrichum citri-aurantii*.

Após o período de incubação as placas foram avaliadas pela contagem de unidade formadora de colônias (UFC). Este experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com três repetições para cada combinação de temperatura e tempo, considerando uma placa como unidade experimental. Utilizou-se a metodologia do Planejamento composto

central (CCD) (Anexo I) com o objetivo de otimizar os níveis das variáveis obtendo a melhor resposta. Considerou-se como variáveis (fatores) a temperatura (°C) e o tempo de exposição (segundos); como resposta a unidade formadora de colônias (UFC).

Para a realização desse experimento estudou-se os níveis entre 51,9°C a 66°C para a variável temperatura e 11 a 45 segundos para a variável tempo, que correspondem ao ponto axial (+ α e - α). O conjunto de níveis estudados para cada variável estão descritos na Tabela 3. Para a escolha dos níveis tomou-se como referência os valores de temperatura e tempo de exposição em água quente estudados por Smilanick *et al.* (2003) no controle da germinação de esporos de *Geotrichum citri-aurantii*. Os autores avaliaram a temperatura de 54,4 a 64°C e tempo de 15 e 30 segundos.

Tabela 3. Níveis e fatores utilizados no planejamento composto central esférico (CCD) para avaliar o efeito do tratamento hidrotérmico na germinação de esporos de *Geotrichum citri-aurantii*.

Fatores	Níveis				
	- α	-1	0	+1	+ α
Temperatura (°C)	51,9	54	59	64	66
Tempo (s)	11	16	28	40	45

$\alpha = 1,41421$

Através do planejamento obteve-se treze ensaios (experimentos), sendo: quatro experimentos no ponto fatorial, quatro no ponto axial e cinco repetições no ponto central. Esses ensaios estão descritos na Matriz de planejamento (Tabela 4). A ordem dos ensaios foi realizada de maneira aleatória para minimizar a interferência de condições externas.

Tabela 4. Matriz de planejamento composto central esférico (CCD) com os níveis codificados e decodificados no estudo de duas variáveis (temperatura e tempo) para avaliar o efeito *in vitro* do tratamento hidrotérmico na diminuição das unidades formadoras de colônias (UFC) de *Geotrichum citri-aurantii*.

	Ensaio	Variáveis Codificadas		Variáveis Decodificadas	
		Temperatura	Tempo	Temperatura (°C)	Tempo (s)
Pontos fatoriais	01	-1	-1	54	16
	02	1	-1	64	16
	03	-1	1	54	40
	04	1	1	64	40
Pontos axiais	05	- α	0	51,9	28
	06	+ α	0	66,0	28
	07	0	- α	59	11
	08	0	+ α	59	45
Pontos centrais	09	0	0	59	28
	10	0	0	59	28
	11	0	0	59	28
	12	0	0	59	28
	13	0	0	59	28

6.2.1.2. Efeito da temperatura na inibição do crescimento micelial

Com auxílio de um canudo estéril (5 mm de diâmetro) foram repicados oito discos da borda da colônia em crescimento ativo de *G. citri-aurantii*, colocadas sobre gaze estéril. Em um balão de vidro com três bocas (500 mL) contendo água destilada esterilizada foi inserido em uma das bocas um termômetro (E-400, Instrutherm, Freguesia, São Paulo, Brasil) e em outra o agitador (Merse Artigos para laboratório, Campinas, São Paulo, Brasil), ajustado a velocidade de 780 rpm. Na terceira boca, com ajuda de uma pinça metálica flambada, a bolsa foi imersa em temperatura pré ajustada de 53,8 a 62,2°C e tempo de exposição entre 15 a 49 segundos, que correspondem ao nível $-\alpha$ e $+\alpha$ (Tabela 5). Após o tempo do tratamento, as bolsas foram imersas em água destilada estéril a $12\pm 2^\circ\text{C}$ por 1 minuto (para interromper o efeito do aquecimento). Em seguida cada disco de meio BDA contendo o micélio fúngico foi colocado sobre meio BDA contido em placa de Petri (90x15 mm). Essas placas foram vedadas com parafilme e incubadas em sala climatizada com luz natural (sem controle de fotoperíodo) a $23\pm 2^\circ\text{C}$ por 72 horas.

Após período de incubação, com auxílio do paquímetro digital (150mm, MTX, Hong Kong, China) foi realizada diariamente a medição do crescimento da colônia em dois sentidos ortogonais, até que a colônia de uma das placas atingisse a borda da placa de Petri. Este experimento foi otimizado através do CCD e conduzido em delineamento inteiramente casualizado com três repetições para cada ensaio, considerando uma placa como unidade experimental. Considerou-se no planejamento CCD como variável a temperatura (°C) e o tempo de exposição (segundos) e como resposta o diâmetro da colônia (mm).

Tabela 5. Níveis e fatores utilizados no planejamento composto central esférico (CCD) para avaliar o efeito do tratamento hidrotérmico no crescimento micelial de *Geotrichum citri-aurantii*.

Fatores	Níveis				
	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
Temperatura (°C)	53,8	55	58	61	62,2
Tempo (s)	15	20	32	44	49
$\alpha = 1,41421$					

Através do planejamento obteve-se treze experimentos que estão descritos na Matriz de planejamento (Tabela 6). Realizou-se os ensaios de maneira aleatória.

Tabela 6. Matriz de planejamento composto central esférico (CCD) com os níveis codificados e decodificados no estudo de duas variáveis (temperatura e tempo) para avaliar o efeito *in vitro* do tratamento hidrotérmico na diminuição do crescimento micelial de *Geotrichum citri-aurantii*.

Ensaio	Variáveis Codificadas		Variáveis Decodificadas		
	Temperatura	Tempo	Temperatura (°C)	Tempo (s)	
Fatoriais	01	-1	-1	55	20
	02	1	-1	61	20
	03	-1	1	55	44
	04	1	1	61	44
Axiais	05	- α	0	53,8	32
	06	+ α	0	62,2	32
	07	0	- α	58	15
	08	0	+ α	58	49
Centrais	09	0	0	58	32
	10	0	0	58	32
	11	0	0	58	32
	12	0	0	58	32
	13	0	0	58	32

6.2.2. Efeito da radiação UV-C no controle de crescimento do fungo

6.2.2.1. Protótipo para aplicação da Radiação UV-C

Para aplicação da radiação UV-C utilizou-se um irradiador protótipo de dimensões 66 x 47 x 47 cm (altura x largura x comprimento) instalado no Laboratório de Pós-colheita da Embrapa Meio Ambiente. Conforme apresentado na Figura 11, suas paredes são de acrílico, que impede a passagem da radiação e a parte superior interna contém uma lâmpada germicida Osram (Puritec, HNS – 36W não filtrada, com emissão de radiação concentrada no comprimento de onda do UV-C de 253,7 nm, a 46 cm da superfície irradiada). A fluência da luz na superfície irradiada foi de 0,035 W/m², medida com um radiômetro (Medidor de energia óptica, modelo 1830C UVx, Newport digital Corporation, EUA). A intensidade da radiação se manteve constante durante a irradiação e a dose variava de acordo com o tempo de exposição, utilizando-se a equação 1 (Konda *et al.*, 2018; Terao *et al.*, 2014):

$$T(s) = \frac{D(kJ/m^2)}{I(W/m^2)} \quad (1)$$

Onde D (dose de radiação) é a quantidade de energia aplicada a uma superfície, T é o tempo de exposição e I é a fluência da lâmpada de UV-C.

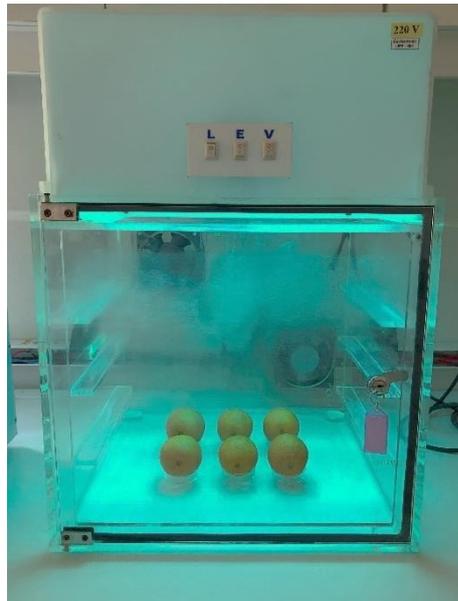


Figura 11. Protótipo para aplicação da radiação UV-C, utilizado nos experimentos *in vitro* e *in vivo*.

6.2.2.2. Efeito da radiação UV-C na inibição da germinação de esporos

Em uma placa de Petri pequena (60x15mm) foram depositados 3 mL da suspensão de artroconídios de *G. citri-aurantii* (1×10^3 artroconídios/mL). As placas foram colocadas abertas no irradiador e submetidas à seguinte dose de UV-C: 0 kJ/m² (tempo de aplicação na testemunha = 0 s); 0,01 kJ/m² (2,8 s); 0,02 kJ/m² (5,6 s); 0,025 (7 s); 0,05 (14 s); 0,10 kJ/m² (28 s); 0,20 kJ/m² (56 s) e 0,25 kJ/m² (70 s). Após o tratamento, uma alíquota de 100 µL da suspensão de esporos irradiada foi transferida e espalhada com uma alça de Drigalski em uma placa com meio BDA. As placas foram vedadas com parafilme e incubadas em uma sala climatizada a temperatura de 23±2°C com luz natural (sem controle de fotoperíodo) por 72 horas. Após o período de incubação as placas foram avaliadas pela contagem de unidade formadora de colônias (UFC).

6.2.2.3. Efeito da radiação UV-C na inibição do crescimento micelial

Discos de micélio da borda da colônia em crescimento ativo de *G. citri-aurantii* (aproximadamente 5 mm de diâmetro) foram fragmentados com auxílio de um canudo esterilizado. Um disco foi depositado no centro de uma placa de Petri com meio BDA. As placas (sem tampa) foram dispostas dentro do equipamento e receberam as seguintes doses de UV-C: 0 kJ/m² (tempo de exposição na testemunha = 0 min); 0,25 kJ/m² (70 s); 0,5 kJ/m² (140 s); 1,0 kJ/m² (280 s); 2,0 kJ/m² (560 s); 3,0 kJ/m² (840 s); 4,0 kJ/m² (1120 s); 5,0 kJ/m² (1400 s). Após o tratamento, as placas foram vedadas com parafilme e alojadas em uma sala climatizada a temperatura de 23±2°C com luz natural (sem controle de fotoperíodo) por 72 horas. A medição do diâmetro da colônia foi realizada diariamente, a partir do 3º dia, durante 7 dias, com um paquímetro digital.

O delineamento experimental de ambos os experimentos com radiação UV-C foram inteiramente casualizados com cinco repetições para cada dose de radiação.

6.2.3. Combinação da temperatura e da radiação UV-C

6.2.3.1. Efeito do tratamento combinado na inibição da germinação de esporos

Neste experimento combinou-se as metodologias descritas nos itens 6.2.1.1. e 6.2.2.2., visando avaliar o efeito conjunto do tratamento hidrotérmico com a radiação UV-C na inibição da germinação de esporos. No entanto, no momento de transferir a suspensão do tubo de ensaio para a placa de Petri e submetê-la a UV-C, utilizou-se uma placa de 30x10mm ao invés da placa de 60x15mm, devido a menor quantidade de suspensão. Após os tratamentos as placas foram vedadas e mantidas em uma sala climatizada a temperatura de 23±2°C com luz natural (sem controle de fotoperíodo) por 72 horas. Após o período de tempo, avaliou-se o experimento pela contagem da unidade formadora de colônias (UFC). O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado com três repetições, considerando uma placa de Petri como unidade experimental. Esse experimento foi otimizado utilizando o planejamento CCD para três variáveis: temperatura e tempo de exposição ao tratamento hidrotérmico e tempo de exposição à radiação UV-C. Os níveis estudados estão descritos na Tabela 7.

Tabela 7. Níveis e fatores utilizados no planejamento composto central esférico (CCD) para avaliar o efeito da temperatura e da radiação UV-C na germinação de esporos de *Geotrichum citri-aurantii*.

Fatores	Níveis				
	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
Temperatura (°C)	52,95	55	58	61	63,05
Tempo (s)	12	20	32	44	52
Tempo UV-C (s)	18	20	23	26	28

$\alpha = 1,6818$

O planejamento gerou dezenove experimentos, sendo oito ensaios no ponto fatorial, quatro no ponto axial e sete no ponto central, conforme Tabela 8.

Tabela 8. Matriz de planejamento composto central esférico (CCD) com os níveis codificados e decodificados para estudo de três variáveis (temperatura, tempo de exposição ao tratamento hidrotérmico e tempo de UV-C), para avaliar o efeito combinado do tratamento hidrotérmico e da radiação UV-C na diminuição das unidades formadoras de colônias (UFC) de *Geotrichum citri-aurantii*.

Ensaio	Variáveis Codificadas			Variáveis Decodificadas			
	Temperatura	Tempo	Tempo UV-C	Temperatura (°C)	Tempo (s)	Tempo UV-C (s)	
Fatoriais	1	-1	-1	-1	55	20	20
	2	1	-1	-1	61	20	20
	3	-1	1	-1	55	44	20
	4	1	1	-1	61	44	20
	5	-1	-1	1	55	20	26
	6	1	-1	1	61	20	26
	7	-1	1	1	55	44	26
	8	1	1	1	61	44	26
Axiais	9	- α	0	0	52,9	32	23
	10	+ α	0	0	63	32	23
	11	0	- α	0	58	12	23
	12	0	+ α	0	58	52	23
Centrais	13	0	0	- α	58	32	18
	14	0	0	+ α	58	32	28
	15	0	0	0	58	32	23
	16	0	0	0	58	32	23
	17	0	0	0	58	32	23
	18	0	0	0	58	32	23
	19	0	0	0	58	32	23

6.2.4. Análise dos dados

Metodologia da superfície de resposta: Para o cálculo dos valores dos níveis de cada variável e a matriz de planejamento utilizou-se a planilha CCD do Microsoft® Excel elaborada por Teófilo e Ferreira (2006). Foram calculados os termos lineares, quadráticos e os termos de interação sobre a resposta utilizando-se o software Estatística (versão 7.0, Statsoft®). Foi realizada a Análise de variância (ANOVA) ao nível de confiança de 95% ($p \leq 0,05$), para avaliar a significância das variáveis individualmente, a interação entre elas e a falta de ajuste do modelo. Após a análise, gerou-se o gráfico de efeitos (Pareto) e a superfície de resposta. A partir da superfície pode-se determinar os níveis ótimos das variáveis.

Radiação UV-C: Os dados obtidos no experimento de crescimento micelial foram analisados por ANOVA e através da Análise de agrupamento (Cluster Analysis), pelo método hierárquico, utilizando-se a distância euclidiana, pelo software Statistica (versão 7.0, Statsoft®). A média dos dados obtidos no experimento de crescimento micelial foram comparadas pelo Teste de Scott-Knott, a nível de confiança de 95% ($p \leq 0,05$), usando o software Sisvar (versão 5.6; Ferreira, 2020).

6.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.3.1. Efeito da temperatura

6.3.1.1 Efeito na inibição da germinação de esporos

De acordo com a ANOVA (Tabela 9), com os níveis estudados, pode-se observar que somente o termo linear da variável temperatura foi significativo (valor p menor que 0,05) para a diminuição das UFC, ou seja, essa variável exerce maior influência sobre a resposta. Observa-se também que a interação entre o tempo e temperatura não foi significativa.

Tabela 9. Tabela da Análise da variância (ANOVA) para os resultados obtidos no planejamento experimental para avaliar o efeito do tempo (s) e temperatura ($^{\circ}\text{C}$) na germinação de esporos de *Geotrichum citri-aurantii*.

Fatores	SS	df	MS	F	P
Tempo (L)	11,951	1,000	11,951	3,489	0,135
Tempo (Q)	2,300	1,000	2,300	0,671	0,458
Temperatura (L)	63,882	1,000	63,882	18,651	0,012
Temperatura (Q)	8,039	1,000	8,039	2,347	0,200
Tempo x Temperatura	0,250	1,000	0,250	0,072	0,800
Falta de ajuste	4,416	3,000	1,472	0,429	0,743
Erro puro	13,700	4,000	3,425		
Total SS	103,576	12			

SS= soma quadrática; df = grau de liberdade; MS= média quadrática;
F=teste F; p= nível de confiança de 95% ($p \leq 0,05$); L=termo linear; Q=termo quadrático; as variáveis que foram significativas estão descritas em vermelho

Através do gráfico de Pareto (Figura 12) pode-se observar melhor a significância de cada variável.

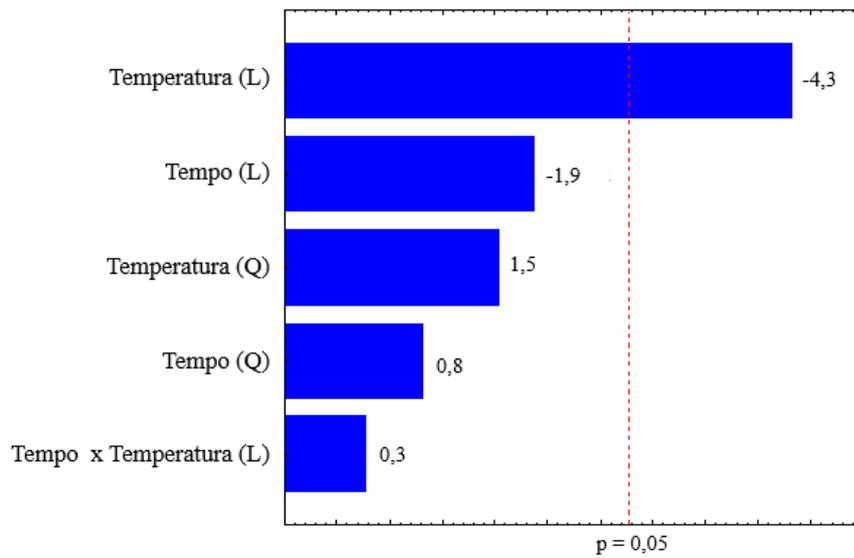


Figura 12. Gráfico de Pareto obtido através do planejamento composto central (CCD) para verificar a significância de cada variável ($p \leq 0,05$).

Os gráficos de superfície de resposta e de contorno (Figuras 13 A e B) representam o efeito da temperatura e tempo na inibição das unidades formadoras de colônias (UFC). A região vermelha indica um alto número de colônias e, à medida que ocorre a diminuição das colônias, a tonalidade muda até chegar à cor verde escura, indicando a inibição total na germinação de esporos.

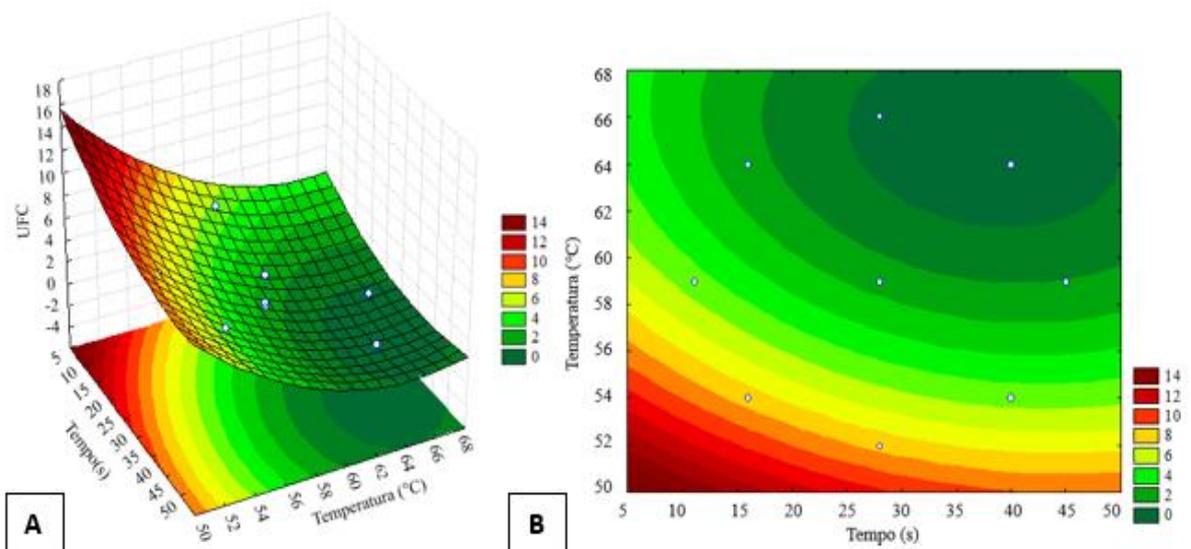


Figura 13. Gráficos de superfície de resposta (A) e de contorno (B) obtidos a partir do planejamento composto central para avaliar o efeito do tempo (s) e temperatura (°C) na germinação de esporos de *Geotrichum citri-aurantii*

O modelo matemático que representa a superfície de resposta e de contorno (Figuras 13 A e B) está representado pela equação 2, onde z = unidades formadoras de colônias (UFC); x = tempo de exposição (segundos) e y =temperatura (°C).

$$z=197,49359401228-,57130042978871*x+,0039930555555558*x^2- \quad (2)$$

$$5,7558317096117*y+,0430000000000001*y^2+,0041666666666666*x*y$$

Verificou-se que temperaturas acima de 62°C e tempo de exposição na faixa entre 30 e 50 segundos promovem uma inibição significativa na germinação de esporos. Conforme representado no gráfico de Pareto (Figura 12), a temperatura é o fator que contribui significativamente na inibição, portanto para temperaturas abaixo de 62°C, independente do tempo de exposição não houve diminuição significativa de UFCs.

A temperatura de controle verificada a partir de 62°C está próxima à observada por Smilanick *et al.* (2003), em que a inibição na germinação de esporos de *G. citri-aurantii* ocorreu na faixa de 58,9°C por 30 segundos.

Os resultados *in vitro* indicam que o *G. citri-aurantii* é mais termorresistente ao calor do que o *P. digitatum*, em que o tratamento hidrotérmico inibiu completamente a germinação de esporos de *P. digitatum* a 55°C por 15 segundos (Terao *et al.*, 2017).

6.3.1.2 Efeito da temperatura no crescimento micelial

Para avaliar a interação entre a variável temperatura e tempo e a influência no crescimento micelial de *G. citri-aurantii* utilizou-se o planejamento CCD, variando-se os níveis +1 e -1 dos fatores baseados no trabalho realizado por Eschionato *et al.* (2017), que avaliou a temperatura de 52°C a 65°C, no controle de *Lasiodiplodia Theobromae* em mamão. O micélio se mostrou termorresistente na combinação de 62°C por 20 segundos.

Os resultados da ANOVA (Tabela 10) e o gráfico de Pareto (Figura 14) mostraram que o modelo é satisfatório, não necessitando de ajuste. Nos níveis estudados todos os termos de todas as variáveis mostraram-se significativos: termo linear da variável tempo e temperatura; termo quadrático da temperatura e tempo (indicando que nos eixos correspondentes à temperatura e tempo possuem uma curvatura) e há interação entre as variáveis.

Tabela 10. Análise de variância (ANOVA) para os resultados obtidos no planejamento experimental para avaliar o efeito do tempo (s) e temperatura (°C) no crescimento micelial de *Geotrichum citri-aurantii*.

Fatores	SS	df	MS	F	P
Tempo (L)	331,285	1,000	331,285	258,661	0,000
Tempo (Q)	78,023	1,000	78,023	60,919	0,001
Temperatura (L)	1888,576	1,000	1888,576	1474,563	0,000
Temperatura (Q)	522,793	1,000	522,793	408,187	0,000
Tempo x Temperatura	220,820	1,000	220,820	172,412	0,000
Falta de ajuste	8,809	3,000	2,936	2,293	0,219912
Erro puro	5,123	4,000	1,281		
Total SS	3012,230	12,000			

SS= soma quadrática; df = grau de liberdade; MS= média quadrática; F=teste F; p= nível de confiança de 95% ($p \leq 0,05$); L=termo linear; Q=termo quadrático; as variáveis que foram significativas estão descritas em vermelho

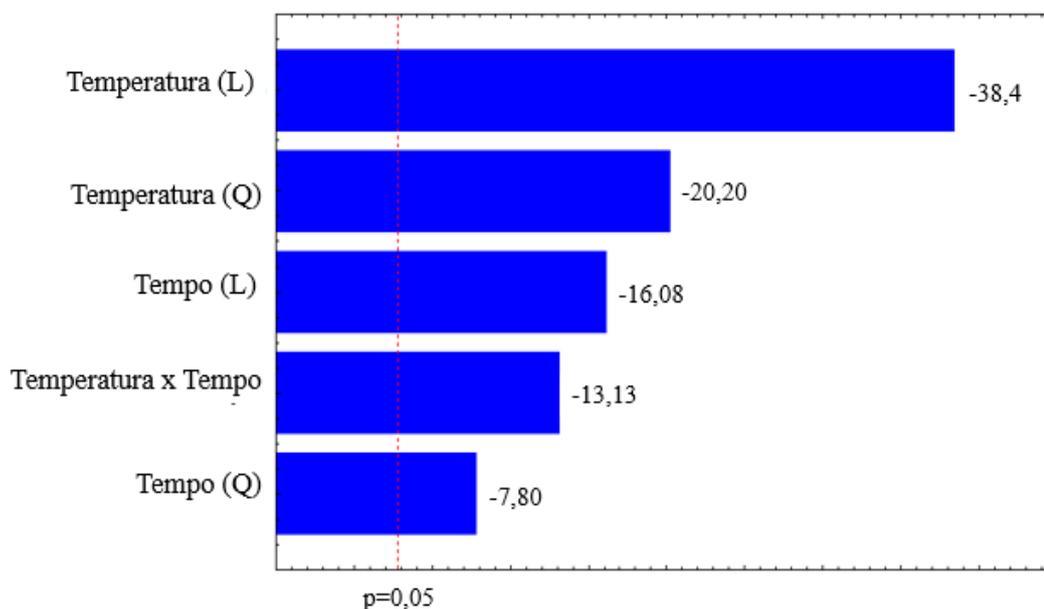


Figura 14. Gráfico de Pareto obtido através do planejamento composto central (CCD) para observar o efeito da variável tempo (s) e temperatura (°C) no crescimento micelial de *Geotrichum citri-aurantii*.

Na superfície de resposta gerada (Figura 15), a partir da região de coloração laranja ocorre a inibição no crescimento micelial de *G. citri-aurantii*. O modelo matemático (equação 3) da superfície de resposta (Figura 15) apresenta valores negativos -20 e -40, porém, os dados

reais a partir de 0 não ocorre crescimento micelial. Observou-se que a 60°C houve inibição no desenvolvimento de *G. citri-aurantii*, porém utilizando-se tempo de exposição longo (a partir de 55 segundos) e conforme aumentou-se a temperatura para 62°C houve uma diminuição no tempo de exposição para 45 segundos. Através desse resultado, observou-se haver interação entre a variável temperatura e tempo, ou seja, o efeito de uma variável depende do efeito da outra.

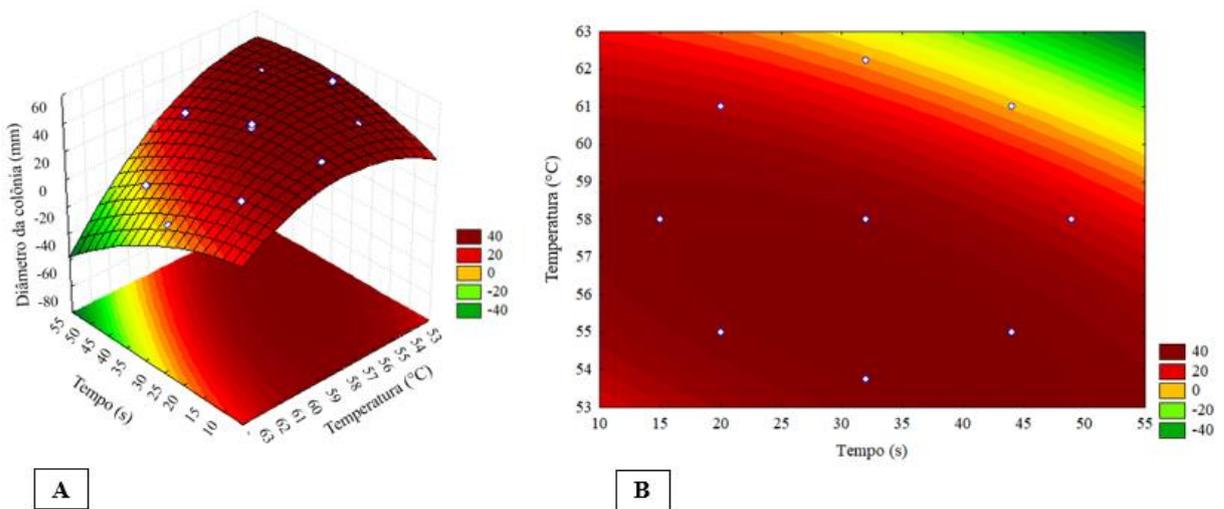


Figura 15. Gráficos de superfície de resposta (A) e de contorno (B) obtidos a partir do planejamento composto central (CCD) para otimização da temperatura (°C) e tempo de exposição (s) na inibição do crescimento micelial de *Geotrichum citri-aurantii*.

$$z = -3292,4745376776 + 12,922740944003 * x - 0,02325694444445 * x^2 + 113,21667710201 * y - 0,96322222222298 * y^2 - 0,20638888888892 * x * y \quad (3)$$

Onde: z= diâmetro da colônia (mm); x= tempo de exposição (segundos) e y= temperatura (°C).

6.3.2. Efeito da radiação UV-C

6.3.2.1. Efeito da radiação UV-C na inibição da germinação de esporos do *G. citri-aurantii*.

Iniciou-se o estudo avaliando-se as seguintes doses: 0,25 kJ/m² (70 s); 0,5 kJ/m² (140 s); 1 kJ/m² (280 s); 2 kJ/m² (560 s); e 3 kJ/m² (840 s), porém como em todas essas doses houve inibição na germinação de esporos, realizou-se novos testes aplicando-se doses menores: 0,01 kJ/m² (2,8 s); 0,02 kJ/m² (5,6 s); 0,025 (7 s); 0,05 (14 s); 0,10 kJ/m² (28 s); 0,20 kJ/m² (56 s) e 0,25 kJ/m² (70 s). Baixas doses de radiação UV-C (0,2, 0,4, 0,84, 1,3 e 2,4 kJ/m²) também foram utilizadas por Cia *et al.* (2007), no controle da germinação de esporos de *C. gloeosporioides* em mamão.

Com base nos resultados (Figura 16), observou-se que a Testemunha e a dose 1 (0,01 kJ/m²) apresentaram crescimento de colônias similares, e a que partir da dose 2 (0,02 kJ/m²) houve inibição crescente na germinação de esporos.

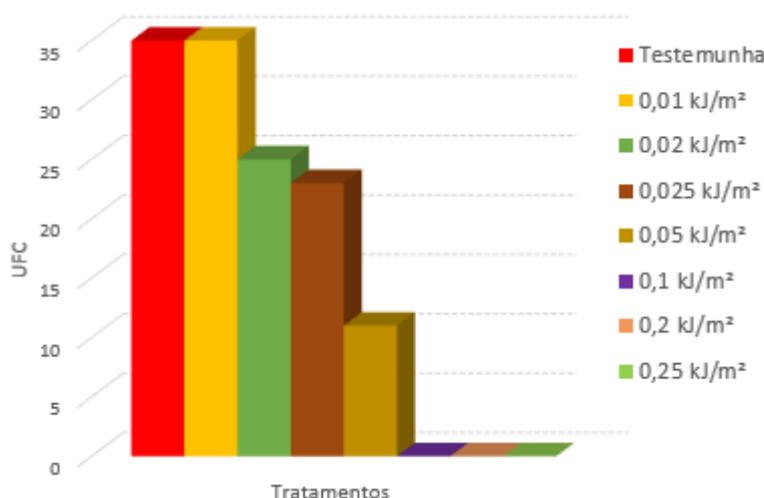


Figura 16. Número de unidade formadora de colônias (UFCs) de *Geotrichum citri-aurantii*, após a exposição à radiação UV-C nas doses: Testemunha = 0 kJ/m² (0 s); Dose 1 = 0,01 kJ/m² (2,8 s); Dose 2 = 0,02 kJ/m² (5,6 s); Dose 3 = 0,025 (7 s); Dose 4 = 0,05 (14 s); Dose 5 = 0,10 kJ/m² (28 s); Dose 6 = 0,20 kJ/m² (56 s) e Dose 7 = 0,25 kJ/m² (70 s).

A germinação de esporos de *G. citri-aurantii* foi completamente inibida a partir da dose de 0,10 kJ/m², e não diferiu da dose 0,20 e 0,25 kJ/m². A sensibilidade dos esporos à radiação também foi demonstrada no trabalho de Nuratika *et al.* (2018), em que a dose de 0,10 kJ/m² foi efetiva na redução da germinação de esporos de *Fusarium spp.* em banana ‘Berangan’. Já no

controle de *C. gloesporioides* em manga 'Chok Anan', necessitou de 14,4 kJ/m² para inibir completamente a germinação dos esporos (Gunasegaran *et al.*, 2018).

Segundo Terao *et al.* (2019), nos estudos *in vitro*, a radiação UV-C mostrou-se eficiente na inibição da germinação de esporos de fungos causadores da podridão peduncular em mamão e que a dose letal varia conforme a espécie fúngica. Para *Fusarium solani*, a dose de 0,6 kJ/m² foi suficiente para inibir 98% da germinação de esporos e para *L. theobromae* foi necessária uma dose de 1,0 kJ/m². Enquanto que para *A. alternata* e *C. gloesporioides* foi necessária uma dose de 0,5 kJ/m².

6.3.2.2. Efeito da radiação UV-C no crescimento micelial do *G. citri-aurantii*.

A Figura 17 demonstra que as doses estudadas não inibiram o crescimento micelial de *G. citri-aurantii*, mesmo na dose 5 kJ/m², apenas diminuíram o crescimento micelial, diferindo significativamente da testemunha a partir da dose de 2 kJ/m².

Comportamento semelhante foi relatado por Silva (2006) para laranja 'Valência', em que as doses 0,52; 1,04; 3,13; 10,44 e 15,66 kJ/m² também não inibiram o crescimento micelial de *Guinardia citricarpa*, porém a dose de 15,66 kJ/m² ocasionou o menor crescimento. Bassetto *et al.* (2007) estudaram as doses de 1,04 a 31,32 kJ/m² na redução do crescimento micelial de *Monilinia fructicola* de pêssegos, e observou que o crescimento micelial foi reduzido a partir de doses maiores que 10,44 kJ/m² e a completa inibição ocorreu a 31,32 kJ/m².

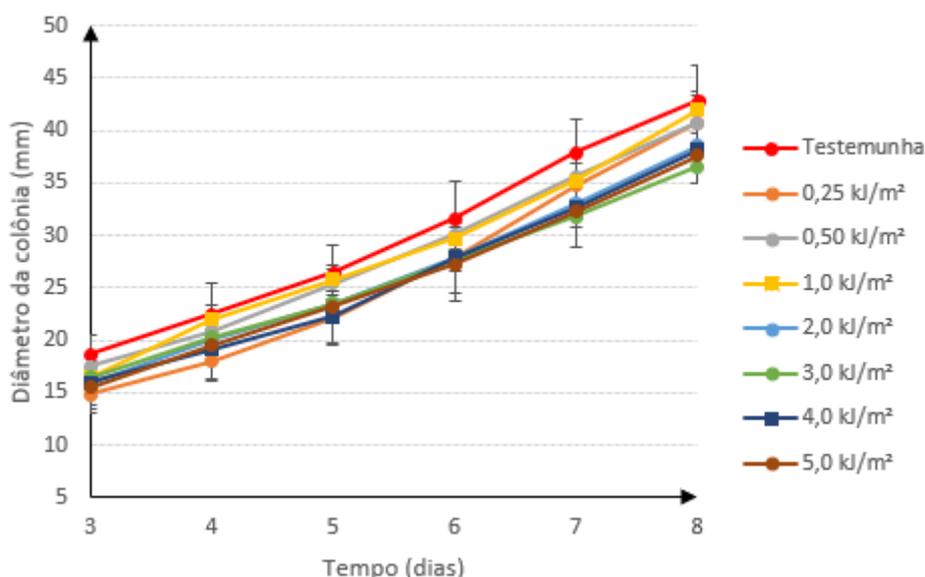


Figura 17. Crescimento micelial de *Geotrichum citri-aurantii* submetido à radiação UV-C nas seguintes doses: Testemunha = 0 kJ/m² (0 min); Dose 1 = 0,25 kJ/m² (70 s); Dose 2 = 0,5 kJ/m²

(140 s); Dose 3 = 1,0 kJ/m² (280 s); Dose 4 = 2,0 kJ/m² (560 s); Dose 5 = 3,0 kJ/m² (840 s); Dose 6 = 4,0 kJ/m² (1120 s); Dose 7 = 5,0 kJ/m² (1400 s). As barras verticais representam o erro padrão das estimativas das médias dos tratamentos.

Para identificar a semelhança entre as diferentes doses, utilizou-se um dendrograma para agrupá-las, apresentado na Figura 18. A análise de agrupamento é a formação de grupos de indivíduos com base na similaridade ou distância entre a média dos grupos (Assis *et al.*, 2019). Quando as distâncias estão próximas, indica que há similaridade entre os tratamentos. Traçando-se uma linha reta o eixo da distância euclidiana com valor 3,5 mm observa-se a formação de 4 grupos, sendo o primeiro formado pelas doses 4, 5, 6 e 7 (2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 kJ/m², respectivamente); o segundo grupo somente pela dose 1 (0,25 kJ/m²); o terceiro grupo pela dose 2 e 3 (0,5 kJ/m² e 1,0 kJ/m²) e o quarto grupo somente pela testemunha. Observou-se, portanto, alta similaridade entre as doses 0,5 kJ/m² e 1,0 kJ/m², distinguindo-se das doses 2,0 kJ/m² a 5,0 kJ/m², indicando que a partir da dose de 2 kJ/m² houve controle eficiente de *G. citri-aurantii*.

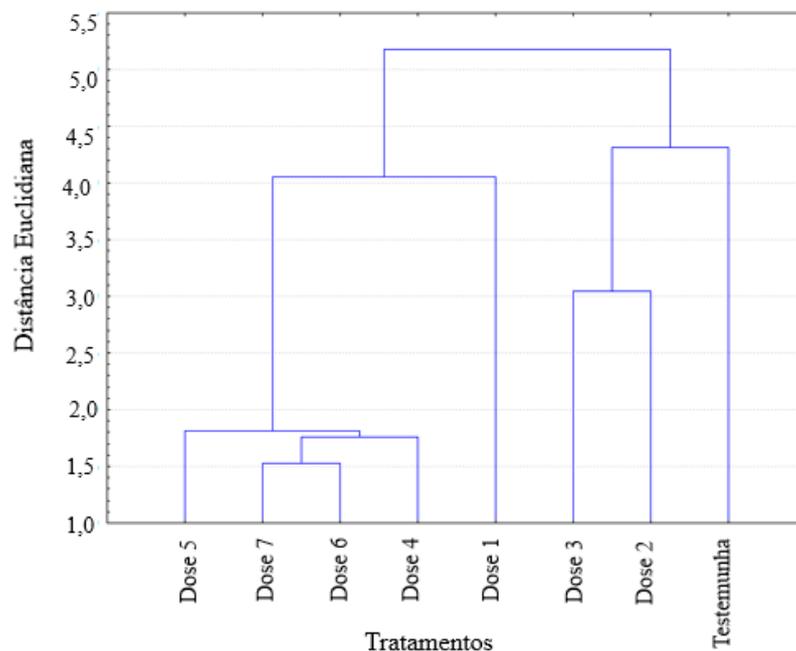


Figura 18. Dendrograma obtido da análise de agrupamento hierárquico do resultado da medição do diâmetro da colônia de *Geotrichum citri-aurantii*, submetido a diferentes doses de radiação UV-C: Testemunha = 0 kJ/m² (0 min); Dose 1 = 0,25 kJ/m² (70s); Dose 2 = 0,5 kJ/m² (140 s); Dose 3 = 1,0 kJ/m² (280 s); Dose 4 = 2,0 kJ/m² (560 s); Dose 5 = 3,0 kJ/m² (840 s); Dose 6 = 4,0 kJ/m² (1120 s); Dose 7 = 5,0 kJ/m² (1400 s).

Realizou-se o teste de Scott-Knott (Tabela 11) para comparar as médias dos tratamentos e observando-se, também, que a partir da dose 2,0 kJ/m² houve diferença significativa no crescimento micelial de *G. citri-aurantii*.

Tabela 11. Resultado do teste Scott-Knott para comparar o efeito de diferentes doses de radiação UV-C no crescimento micelial de *Geotrichum citri-aurantii*. As médias seguidas pelas mesmas letras são significativamente diferentes de acordo com o teste de Scott-Knott, em que $p \leq 0,05$.

Dose de UV-C (kJ/m ²)	Média do diâmetro da colônia	
3	36,56	b
5	37,63	b
4	38,15	b
2	38,54	b
0,25	40,74	a
0,5	40,77	a
1	41,99	a
Testemunha	42,94	a

Através dos resultados obtidos, concluiu-se que a radiação UV-C não inibe o crescimento micelial, possivelmente, devido ao efeito do sombreamento no entrelaçamento das hifas, impedindo que toda massa micelial seja irradiada. Resultados semelhantes também foram observados por Canale *et al.* (2011), em que mesmo a dose elevada de 15,66 kJ/m² controlou a germinação de esporos, mas não afetou o crescimento micelial de *Guignardia citricarpa* de laranjas ‘Valência’. Camilli *et al.* (2004) também relatam que a dose de 0,84 kJ/m² inibiu os esporos de *Botrytis cinerea* de uva ‘Itália’, mas não foi letal para o micélio. Isso indica que o esporo é mais sensível que o micélio.

6.3.3. Efeito da temperatura combinada com a radiação UV-C na inibição da germinação de esporos de *G. citri-aurantii*

De acordo com a Análise de variância (Tabela 12) e o gráfico de Pareto (Figura 19), o termo linear e quadrático da temperatura, tempo no tratamento hidrotérmico e tempo de UV-C foram significativos, assim como a interação entre temperatura e tempo UV-C.

Tabela 12. Análise de variância (ANOVA) para os resultados obtidos no planejamento experimental para avaliar o efeito de três variáveis: tempo (s), temperatura (°C) e tempo de aplicação da UV-C (s) na germinação de esporos de *Geotrichum citri-aurantii*.

Fatores	SS	df	MS	F	P
Tempo (L)	3,269	1,000	3,269	10,897	0,029
Tempo (Q)	8,704	1,000	8,704	29,014	0,005
Temperatura (L)	95,616	1,000	95,616	318,721	0,000
Temperatura (Q)	2,703	1,000	2,703	9,010	0,039
Tempo UV-C (L)	21,388	1,000	21,388	71,293	0,001
Tempo UV-C (Q)	0,099	1,000	0,099	0,331	0,595
Tempo x Temperatura	0,125	1,000	0,125	0,416	0,553
Tempo x Tempo UV-C	0,125	1,000	0,125	0,416	0,553
Temperatura x Tempo UV-C	3,125	1,000	3,125	10,416	0,032
Falta de ajuste	6,836	5,000	1,367	4,558	0,083
Erro puro	1,200	4,000	0,300		
Total SS	142,736	18			

SS= soma quadrática; df = grau de liberdade; MS= média quadrática; F=teste F; p= nível de confiança de 95% ($p \leq 0,05$); L=termo linear; Q=termo quadrático; as variáveis que foram significativas estão descritas em vermelho

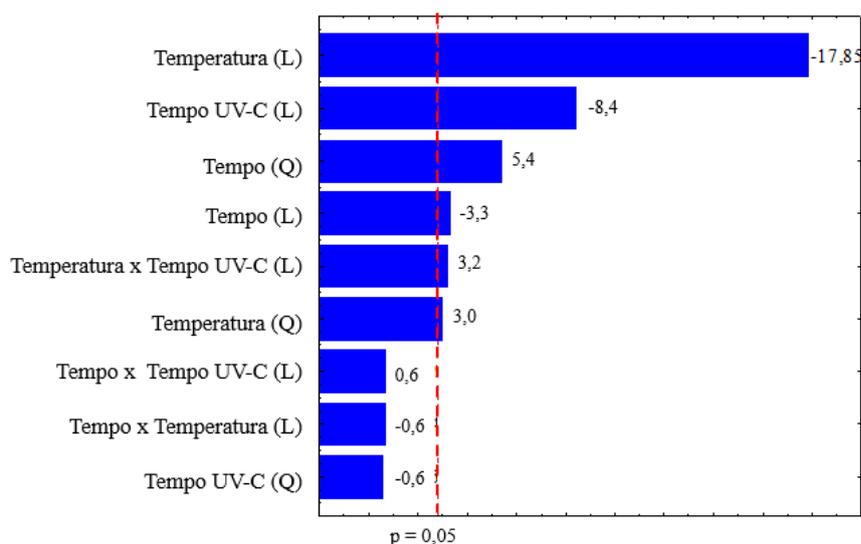


Figura 19. Gráfico de Pareto para avaliar o efeito das variáveis de três variáveis: tempo (s), temperatura (°C) e tempo de aplicação da radiação UV-C (s) na germinação de esporos de *G.citri-aurantii*.

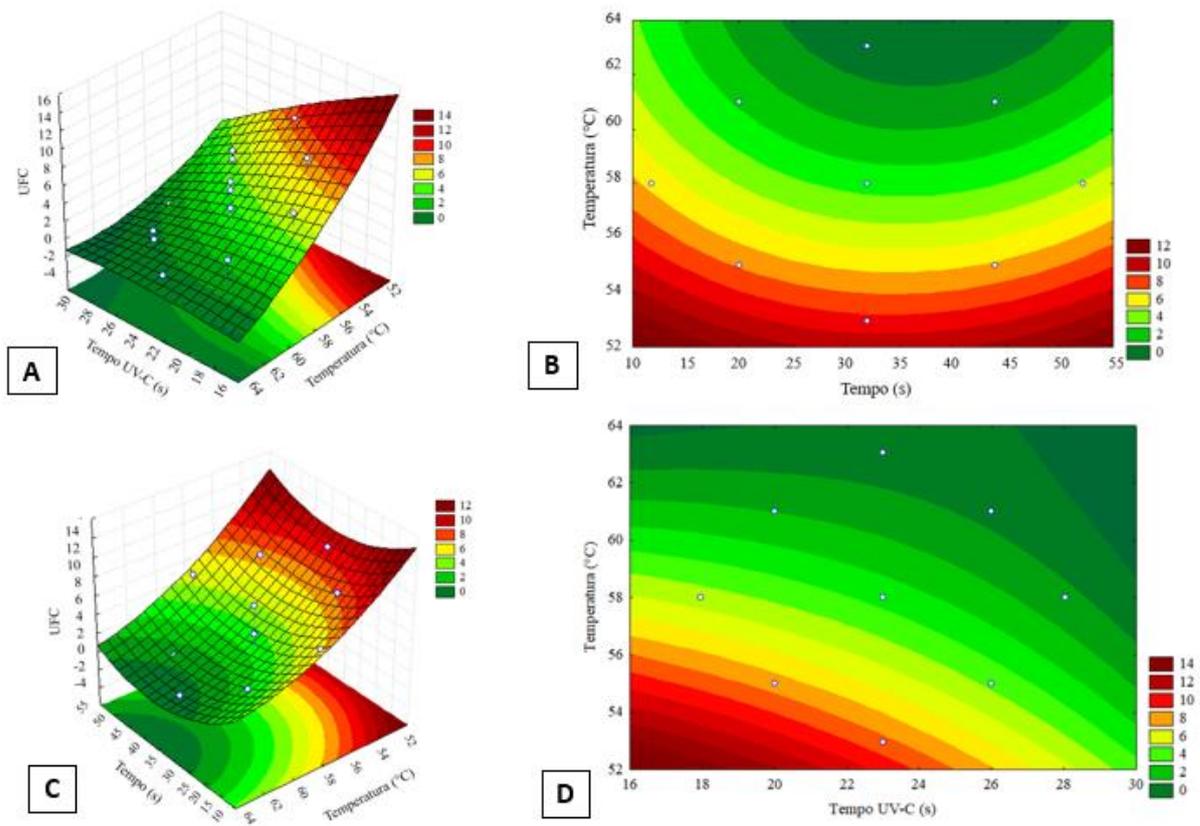


Figura 20. Gráficos de Superfície de resposta (A e C) e de contorno (B e D) obtidos a partir do planejamento composto central para otimização da temperatura (°C) e tempo (s) no tratamento hidrotérmico e tempo de exposição (s) em radiação UV-C na germinação de esporos de *Geotrichum citri-aurantii*.

O modelo que representa a superfície de resposta de temperatura e tempo de exposição em UV-C (Figura 20 A) está descrito pela equação 4, e o modelo de temperatura e tempo no tratamento hidrotérmico (Figura 20 C) na equação 5.

$$z=320,4374588939-,27415355953018*x+,005545459759505*x^2- \quad (4)$$

$$8,1035764766597*y+,049443646086186*y^2-$$

$$0,003472222222182*x*y+0,00347222222219*23,0*x+0,069444444444394*23,0*y-$$

$$99,772896$$

Onde: z= unidades formadoras de colônia (UFC); x = tempo de exposição (s) e y = temperatura (°C).

$$z=320,4374588939-8,1035764766597*y+,049443646086186*y^2-4,1198678496942*x- \quad (5)$$

$$,0094819190127245*x^2-$$

$$0,003472222222182*32,0*y+0,00347222222219*32,0*x+0,069444444444394*y*x-$$

$$3,0943631$$

Onde: z = unidades formadoras de colônia (UFC); x = tempo de exposição em UV-C (s) e y = temperatura (°C).

Os gráficos de superfície e de contorno (Figura 20) demonstram o efeito da temperatura (°C) e tempo (s) combinado com o tempo UV-C. Conforme resultado apresentado no gráfico de Pareto (Figura 19), verificou-se que houve efeito significativo isolado da temperatura e não houve interação significativa entre temperatura e tempo de exposição. Este resultado corrobora com o resultado já obtido em ensaio anterior (Figuras 12 e 13). Assim, na superfície de resposta (Figura 20 B) observa-se que, por exemplo, utilizando-se a temperatura de 62°C por 35 segundos o efeito será o mesmo de se utilizar 40 segundos, ou 64°C nos tempos de 30 ou 45 segundos. Observou-se, também, o efeito significativo da radiação UV-C e sua combinação com a temperatura (Figura 19). As figuras 20 C e D demonstram que, conforme elevasse a temperatura a partir de 60°C é possível diminuir o tempo de exposição UV-C para ter inibição da germinação de esporos, uma vez que as variáveis temperatura e o tempo UV-C interagem entre si.

6.4. CONCLUSÃO

Em relação ao efeito da temperatura na germinação de esporos e crescimento micelial, conclui-se que os esporos são termorresistentes e que ocorre inibição na germinação de esporos a partir 62°C por 35 segundos e de crescimento micelial na faixa de 62°C por 45 segundos.

Os estudos do efeito da radiação UV-C indicaram que os esporos de *G. citri-aurantii* foram inibidos em dose bastante baixa, ao redor de 0,10 kJ/m² (28 s), demonstrando serem bastante sensíveis à radiação. Porém, quanto ao crescimento micelial, a radiação UV-C mesmo na dose de 5 kJ/m² não controlou o patógeno, mas a partir da dose de 2 kJ/m² reduziu a taxa de crescimento. Observou-se também a interação entre a temperatura e a radiação UV-C na inibição da germinação de esporos de *G. citri-aurantii*. O nível de exposição térmica a 62°C por 35 segundos combinado com 28 segundos (dose 0,1 kJ/m²) de exposição em radiação UV-C, inibiram completamente a germinação de esporos de *G. citri-aurantii*.

7. CAPÍTULO III: ESTUDOS *IN VIVO*: EFEITO DA TEMPERATURA E DA RADIAÇÃO UV-C NO CONTROLE DA PODRIDÃO AZEDA EM LARANJA ‘LIMA’.

7.1. RESUMO

Neste capítulo são apresentados os resultados dos tratamentos hidrotérmico e radiação UV-C aplicados diretamente na fruta para o controle da podridão azeda em laranja ‘Lima’. Para isso, laranjas ‘Lima’ foram inoculadas com a concentração da suspensão 1×10^6 arthroconídios/mL de *G. citri-aurantii*, agente causal da podridão azeda quatro horas antes dos tratamentos: hidrotérmico (HWD), radiação UV-C e os tratamentos combinados. O planejamento experimental CCD foi utilizado no experimento do tratamento hidrotérmico para otimizar os parâmetros: temperatura e tempo de exposição para obter a melhor resposta de diminuição da severidade da podridão azeda. No tratamento hidrotérmico as frutas foram imersas em água quente a temperatura entre 60,3 a 71,7°C e tempo de exposição entre 15 a 49 segundos, utilizando-se uma fruta como unidade experimental. Os resultados demonstraram que o tratamento a 62°C por 44 s, apesar de não controlar completamente a doença, diminuiu significativamente sua severidade. Temperaturas acima de 70°C além de não controlarem a doença, causaram danos à epiderme da fruta, aumentando a severidade. Neste trabalho, a severidade da doença foi mensurada observando-se o tamanho da lesão causada na superfície da fruta. Para avaliar o efeito da radiação UV-C na severidade da doença utilizou-se as doses: 0 (testemunha); 0,10; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 kJ/m² e 5,0 kJ/m². De acordo com os resultados, a aplicação da radiação a 4 kJ/m² foi eficiente, apresentando controle da doença. No tratamento combinado foram avaliados os tratamentos que apresentaram os melhores resultados: o hidrotérmico (62°C por 44 segundos), UV-C (4 kJ/m² = 1120 s), hidrotérmico combinado à radiação UV-C (62°C por 44 segundos e 4 kJ/m² = 1120 s) e testemunha. Armazenaram-se as frutas em sala climatizada a temperatura de 28±2°C e 70±2% UR por 12 dias. A partir do 6º dia foi avaliado diariamente o tamanho da lesão com auxílio de um paquímetro. O melhor resultado foi obtido com a aplicação da radiação UV-C a 4 kJ/m² apresentando 85% de controle da doença.

Palavras-chave: tratamento hidrotérmico, radiação UV-C, *Citrus* spp.

7.2. MATERIAL E MÉTODOS

7.2.1 Preparo das laranjas ‘Lima’ e inoculação artificial com a suspensão do *G. citri-aurantii*

Laranjas ‘Lima’ foram trazidas do produtor, selecionadas e desinfestadas superficialmente com hipoclorito de sódio (0,1%). Realizou-se um ferimento na região equatorial das laranjas com a ponta de uma agulha de aço (descrita no Capítulo I, no item Testes preliminares), e inoculou-se com auxílio de uma micropipeta 10 μ L da suspensão do inóculo (1×10^6 arthroconídios/mL). As frutas foram dispostas em caixas de polipropileno, tampadas e levadas à sala climatizada a temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$ por 4 horas, formando uma câmara úmida, conforme descrito no Capítulo I, no item testes preliminares.

7.2.2. Efeito da temperatura e tempo de exposição no controle da podridão azeda em laranja ‘Lima’

As frutas inoculadas foram colocadas em um cesto metálico e imersas em um tanque de aço inox da marca Solab, com capacidade de 30 L e com sistema automático de agitação da água (Dubnoff SL -157, Solab), ajustado para as temperaturas avaliadas, conforme representado na Figura 21. Após os tratamentos, as frutas foram imediatamente mergulhadas em um tanque com água fria ($12 \pm 2^\circ\text{C}$ por 1 minuto), para cessar o efeito da temperatura, secas sobre papel toalha e em seguida acondicionadas em caixas de polipropileno e armazenadas por 12 dias a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ e $70 \pm 2\%$ de umidade relativa. A partir do 6º dia foram realizadas diariamente as avaliações da severidade da doença pela medição do diâmetro da lesão com auxílio do paquímetro digital em dois sentidos ortogonais. Realizou-se a análise dos dados com a média do diâmetro da lesão.



Figura 21. Experimento *in vivo* para avaliar o efeito do tratamento hidrotérmico no controle de *Geotrichum citri-aurantii* em laranja ‘Lima’.

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado com três repetições para cada ensaio, considerando uma fruta como unidade experimental. Realizou-se o planejamento experimental (CCD) e considerou-se como variáveis a temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e o tempo de exposição (s). Estudou-se os níveis entre 60,3 a 71,7 $^{\circ}\text{C}$ para a variável temperatura, e 15 a 49 segundos para a variável tempo, que correspondem aos pontos axiais no planejamento ($+\alpha$ e $-\alpha$). O conjunto de níveis estão descritos na Tabela 13.

Tabela 13. Fatores e níveis estudados no planejamento composto central (CCD) para avaliar o efeito *in vivo* do tratamento hidrotérmico na severidade da podridão azeda em laranja ‘Lima’

Fatores	Níveis				
	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	60,3	62	66	70	71,7
Tempo (segundos)	15	20	32	44	49

$\alpha = 1,41421$

Através do planejamento obteve-se treze experimentos que estão descritos na Matriz de planejamento (Tabela 14). Realizou-se os ensaios em ordem aleatória, para minimizar a interferência de condições externas.

Tabela 14. Matriz de planejamento composto central (CCD) com os níveis codificados e decodificados para estudo de duas variáveis (temperatura e tempo de exposição) para avaliar o efeito *in vivo* do tratamento hidrotérmico na severidade da podridão azeda em laranja ‘Lima’

Ensaio	Variáveis Codificadas		Variáveis Decodificadas	
	Temperatura	Tempo	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tempo (s)
Fatoriais	1	-1	62	20
	2	1	70	20
	3	-1	62	44
	4	1	70	44
Axiais	5	$-\alpha$	60,3	32
	6	$+\alpha$	71,7	32
	7	0	66	15
	8	0	66	49
Centrais	9	0	66	32
	10	0	66	32
	11	0	66	32
	12	0	66	32
	13	0	66	32

7.2.3. Efeito da radiação UV-C no controle a podridão azeda em laranja ‘Lima’

As laranjas foram irradiadas no irradiador anteriormente descrito, avaliando-se as seguintes doses de radiação UV-C: 0 kJ/m² (tempo de exposição da testemunha = 0 s) 0,10 kJ/m² (28 s); 0,5 kJ/m² (140 s); 1,0 kJ/m² (280 s); 2,0 kJ/m² (560 s); 3,0 kJ/m² (840 s); 4,0 kJ/m² (1120 s) e 5,0 kJ/m² (1400 s). Durante o tratamento, para que toda a superfície recebesse a radiação, as frutas foram giradas na metade do tempo de duração de cada tratamento. Após o tratamento, as frutas foram acondicionadas em caixas de polipropileno e cobertas com um tecido preto de maneira a evitar o contato com a radiação, evitando o processo de fotorreativação (Stevens *et al.*, 1998). As caixas foram então levadas para a sala climatizada a 28±2°C e 70±2% de UR. A severidade da doença foi avaliada diariamente a partir do 6º ao 12º dia, com auxílio de um paquímetro digital, realizando-se a medição da lesão em dois sentidos ortogonais. O ensaio foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, utilizando-se 20 repetições para cada tratamento considerando-se uma fruta como unidade experimental.

7.2.4. Tratamento hidrotérmico combinado com a radiação UV-C

Neste experimento foram avaliados 4 tratamentos, escolhendo-se os melhores tratamentos nos ensaios anteriores: hidrotérmico (62°C por 44 segundos), UV-C (4 kJ/m² = 1120 s), hidrotérmico + UV-C (62°C por 44 segundos e 4 kJ/m² = 1120 s) e testemunha (frutas que não foram submetidas a nenhum tratamento), utilizando-se a mesma metodologia descrita nos experimentos anteriores. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com 20 repetições para cada tratamento, considerando-se uma fruta como unidade experimental.

Após os tratamentos, as frutas foram organizadas em caixa de polipropileno e armazenadas por 12 dias a 28±2°C e 70±2% de UR. Avaliando-se diariamente, a partir do 6º dia, a quantidade de frutas infectadas e a severidade através da medição do diâmetro da lesão em dois sentidos ortogonais, com auxílio do paquímetro digital. Para analisar a severidade da doença, utilizou-se a média dos resultados do diâmetro da lesão e calculou-se a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), considerando-se 12 dias de avaliação, através da equação 6, segundo Campbell e Madden, (1990):

$$AACPD = \sum_1^{n-1} \left[\frac{Y_{i+1} + Y_i}{2} \right] * [T_{i+1} - T_i] \quad (6)$$

Onde n é o número de avaliações realizadas, y é o diâmetro da lesão (mm) e t é o tempo de duração das avaliações (dias).

E a porcentagem de inibição (controle) de cada tratamento foi calculada segundo Bastos (1997), através da equação 7:

$$\text{Inibição(\%)} = \frac{\text{númerototaldefrutas} - \text{númerototaldefrutasinfectadas}}{\text{númerototaldefrutas}} \times 100 \quad (7)$$

7.2.5. Análise estatística

Metodologia da superfície de resposta: Os dados do planejamento CCD foram gerados e analisados utilizando-se planilhas do Microsoft® Excel e o pacote estatístico Statística (versão 7.0, Statsoft®). Os resultados obtidos foram submetidos a Análise da variância (ANOVA) ao nível de confiança de 99% ($p \leq 0,01$), para avaliar a significância das variáveis individualmente, a interação entre elas e o ajuste do modelo. Após a análise, gerou-se o gráfico de efeitos (Pareto) (Figura 22) e a superfície de resposta (Figura 23). A partir da superfície pode-se determinar os níveis ótimos das variáveis.

Através dos resultados dos experimentos do efeito da radiação UV-C e o efeito do tratamento combinado no controle de *G. citri-aurantii*, gerou-se a curva do progresso da severidade da doença através do diâmetro médio da lesão de cada tratamento, do 6° ao 12° dia após a inoculação. Calculou-se também a AACPD (equação 6) (Campbell e Madden, 1990) e a porcentagem de inibição (equação 7) (Bastos, 1997). Os dados foram analisados por ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). As análises foram feitas utilizando o software SAS (versão 9.2, SAS Institute, Cary, EUA).

7.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.3.1. Efeito da temperatura e tempo de exposição no controle da podridão azeda em laranja ‘Lima’

Para realizar o planejamento CCD, nos estudos *in vivo*, tomou-se como referência os níveis de inibição do fungo obtidos nos testes *in vitro*, sendo assim determinou-se o nível -1 e +1 da temperatura entre 62 a 70°C e tempo exposição de 20 a 44 segundos. Considerou-se tempo maior de temperatura pois nos trabalhos apresentados por Wang *et al.* (2018), utilizaram

temperaturas maiores, acima de 44 segundos, pois *in vivo* há vários fatores que estão envolvidos, como por exemplo a interação entre o patógeno e o hospedeiro (Plaza *et al.*, 2004).

Nos níveis estudados, somente o termo linear e quadrático da temperatura foram significativos para a mudança na resposta (Tabela 15). A variável tempo e a interação entre tempo e temperatura não foram significativos (Figura 22).

Tabela 15. Análise de variância (ANOVA) para os resultados obtidos no planejamento experimental (CCD) para avaliar o efeito *in vivo* da temperatura (°C) e tempo de exposição (s) na severidade da podridão azeda em laranja ‘Lima’

	SS	df	MS	F	P
Tempo (L)	0,443	1,000	0,443	0,201	0,676
Tempo (Q)	16,764	1,000	16,764	7,613	0,050
Temperatura (L)	497,775	1,000	497,775	226,063	0,000
Temperatura (Q)	194,313	1,000	194,313	88,246	0,000
Tempo x Temperatura	27,562	1,000	27,562	12,517	0,024
Falta de ajuste	74,427	3,000	24,809	11,267	0,020
Erro puro	8,807	4,000	2,201		
Total SS	838,893	12			

SS= soma quadrática; df = grau de liberdade; MS= média quadrática;

F=teste F; p= nível de confiança de 95% ($p \leq 0,05$); L=termo linear; Q=termo quadrático; as variáveis que foram significativas estão descritas em vermelho

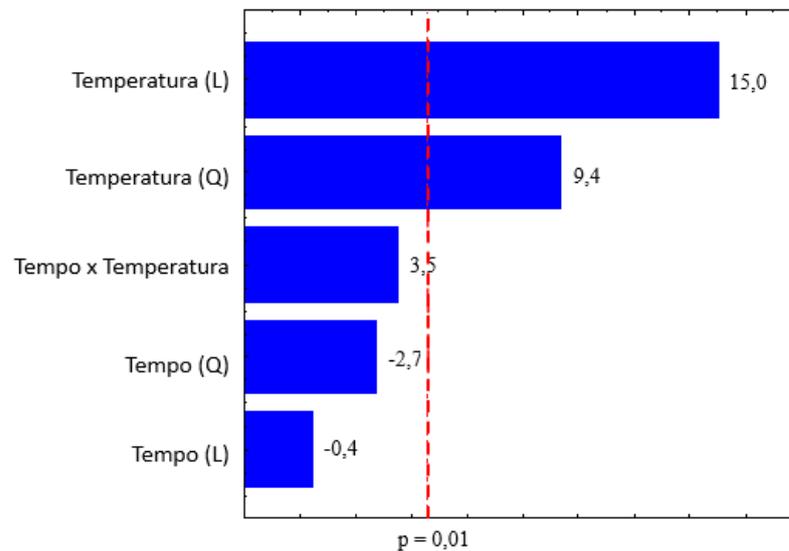


Figura 22. Gráfico de Pareto obtido a partir do planejamento composto central para otimização da temperatura (°C) e tempo de exposição (s) no tratamento hidrotérmico para avaliar o efeito *in vivo* na severidade da podridão azeda em laranja ‘Lima’

Escolheu-se o nível de confiança de 99% ($p \leq 0,01$) porque houve falta de ajuste no modelo gerado (equação 8) no nível de confiança de 95%. E a escolha do nível de confiança de 99% foi para dar mais rigor na avaliação *in vivo*, uma vez que a temperatura apresentou efeito significativo.

$$z = 1444,2368218266 - 2,9390569458674 * x - 0,010780381944444 * x^2 - 43,380260146936 * y + 0,33032031250004 * y^2 + 0,054687499999972 * x * y \quad (8)$$

Onde: z = tamanho da lesão (mm); x = tempo de exposição (segundos) e y = temperatura (°C)

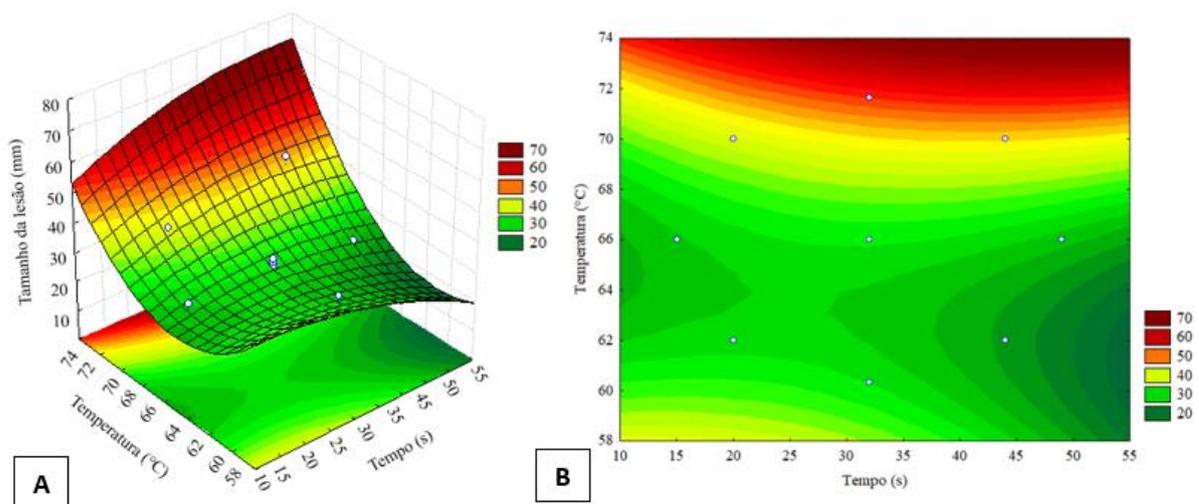


Figura 23. Gráfico de superfície de resposta (A) e de contorno (B) obtidos a partir do planejamento composto central para otimização da temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e tempo de exposição (s) no tratamento hidrotérmico *in vivo* para controle da podridão azeda em laranja ‘Lima’ (causada por *Geotrichum citri-aurantii*)

Os resultados apresentados nos gráficos da superfície de resposta e o de contorno apresentados nas Figuras 23 A e B, demonstram que o tratamento hidrotérmico apesar de não conseguir controlar a doença, reduziu o diâmetro da lesão causada pela podridão azeda na faixa de 58 a 60 $^{\circ}\text{C}$, porém num tempo elevado, ao redor de 55 segundos, sendo que a imersão de frutas em água a 62 $^{\circ}\text{C}$ por 44 segundos apresentou a maior redução na severidade da doença.

Das combinações estudadas, temperaturas de 62 a 66 $^{\circ}\text{C}$ por 44 segundos não apresentaram danos aparentes na fruta. Porém, a partir de 66 $^{\circ}\text{C}$ por 49 segundos observou-se leve escaldadura na epiderme da fruta. No gráfico de Pareto (Figura 22) observamos que a temperatura teve um efeito significativo no controle da doença, no entanto, o gráfico da superfície de resposta (Figura 23) demonstra que temperaturas elevadas causam escaldadura na epiderme aumentando a severidade da doença.

Temperaturas elevadas, acima de 70 $^{\circ}\text{C}$, além de não controlarem a doença, aumentam a severidade, provavelmente devido a lesão causada na epiderme da fruta (Figura 24). Terao *et al.* (2021) relataram que a temperatura de 70 $^{\circ}\text{C}$ a 15 segundos foi eficiente no controle de *F. pallidoroseum* em melão, porém causou escurecimento na epiderme das frutas. No trabalho de Herppich *et al.* (2020), maçãs 'Braeburn' imersas em água quente a 55 $^{\circ}\text{C}$ por 30 segundos não apresentaram lesão por calor ou perda de qualidade, mas assim que imersas a 70 $^{\circ}\text{C}$ por 30 segundos causou danos visíveis a fruta. A utilização de temperaturas excessivas ou banhos por

tempo muito longos danificam a epiderme da fruta, além de causar manchas, abrasão, desenvolvimento de sabores ruins e a fruta se torna mais vulnerável ao ataque de patógenos (Fallik *et al.*, 2020). A incidência de danos aumenta com o aumento da temperatura e duração do tratamento (Sivakumar e Fallik, 2013).

Pontos	Codificados		Decodificados		Resposta	
	Ensaio	Temperatura (°C)	Tempo (s)	Temperatura (°C)		Tempo (s)
Fatoriais	1	-1	-1	62	20	25
	2	1	-1	70	20	41,12
	3	-1	1	62	44	21,7
	4	1	1	70	44	48,32
Axiais	5	- α	0	60,3	32	33,92
	6	+ α	0	71,7	32	48,33
	7	0	- α	66	15	29,49
	8	0	+ α	66	49	25,4
Centrais	9	0	0	66	32	28,46
	10	0	0	66	32	29,45
	11	0	0	66	32	30,55
	12	0	0	66	32	31,88
	13	0	0	66	32	31,79

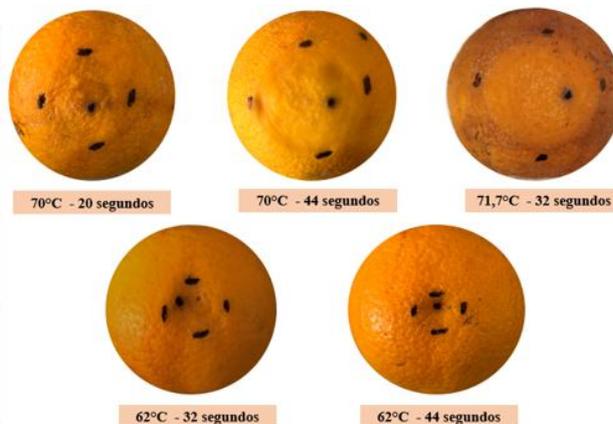


Figura 24. Resultado da matriz de planejamento utilizada para construção da superfície de resposta do efeito do tratamento hidrotérmico no controle da podridão azeda causada por *Geotrichum citri-aurantii*. Laranjas ‘Lima’ foram submetidas ao tratamento hidrotérmico a temperatura entre 60,3 a 71,7°C e 15 a 49 segundos. À direita é apresentado o grau de severidade da doença, corresponde a alguns tratamentos, aos doze dias de armazenamento a 28±2°C e 70±2% de umidade relativa. Os valores em vermelho representam o tamanho da lesão das frutas apresentadas.

Karabulut *et al.* (2010) avaliaram a imersão em água a temperaturas de 24, 50, 55, 60, 65 e 70°C no controle da podridão parda, causada por *Monilinia fructicola*, em pêssigo. A imersão em água a 55°C por 60 segundos ou a 60°C por 30 reduziu significativamente a incidência e a severidade da doença, no entanto a imersão em água a 65°C por 30 segundos causou lesões na epiderme da fruta, aumentando a severidade da doença. Frutas romã foram imersas a 45°C por 2 ou 5 minutos e observou-se que reduziu significativamente o escurecimento da epiderme, porém o tratamento a 65°C causou lesão por calor e aumentou a porcentagem de escurecimento em frutas armazenadas por 3 meses (Mirdehghan e Rahemi, 2005). As respostas das frutas ao tratamento hidrotérmico dependem de seu estágio de maturação, tamanho e peso da fruta, da cultivar e dos parâmetros do tratamento térmico: temperatura, tempo e modo de aplicação (Fallik, 2010).

Nem sempre os resultados de tratamentos nos testes *in vivo* apresentam a mesma eficiência que aqueles obtidos nos testes *in vitro*. Smilanick *et al.* (2003), observaram que a

temperatura a 59,8°C por 30 segundos foi suficiente para inibir o desenvolvimento de *G. citri-aurantii*. No entanto, nos testes *in vivo* o fungo não pode ser controlado eficientemente com o tratamento hidrotérmico.

O modo de ação do tratamento térmico não é apenas a mortalidade do patógeno. Nafussi *et al.* (2001) relataram que em limões inoculados com *P. digitatum* e imersos em água quente houve indução no acúmulo de lignina, escoporona e escopoletina, que estão relacionadas com a resistência do hospedeiro. Limões não tratados com água quente apodreceram rapidamente, dentro de 3 dias. Provavelmente, essas reações de defesa do hospedeiro não sejam suficientes para inibir a infecção causada por *G. citri-aurantii* em laranja ‘Lima’. Além disso, o tratamento hidrotérmico ao mesmo tempo que induz enzimas de defesa da planta, pode induzir a produção de enzimas que causam danos à célula e resulta no estresse oxidativo (Wu *et al.* 2015).

7.3.2. Efeito da radiação UV-C no controle da podridão azeda em laranja ‘Lima’

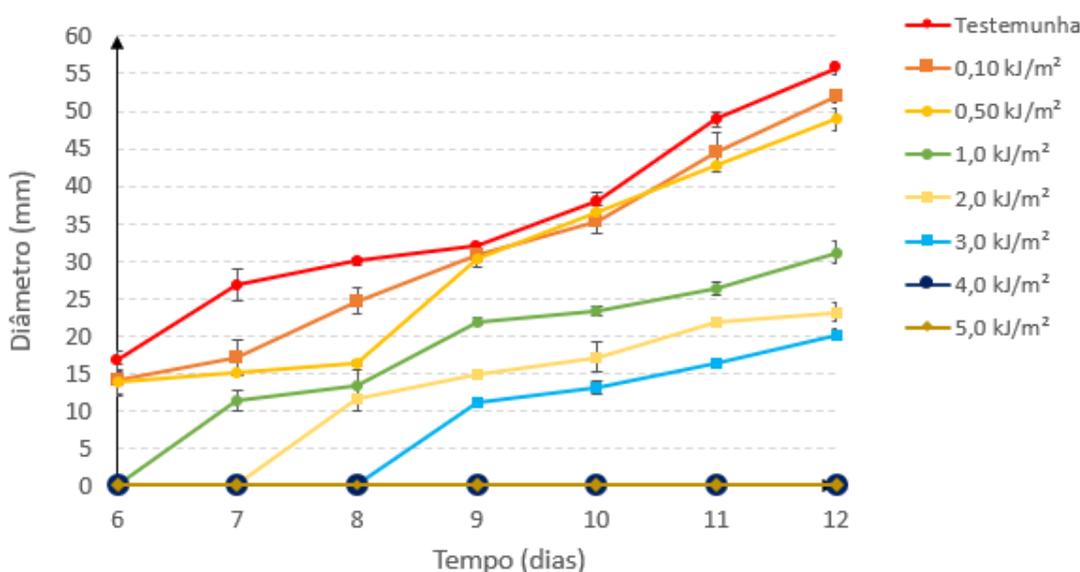


Figura 25. Curva de progresso da lesão da podridão azeda em laranja ‘Lima’, quantificada através do diâmetro médio da lesão 6 dias após as frutas serem inoculadas. As frutas foram inoculadas artificialmente com *Geotrichum citri-aurantii* e irradiadas com sete diferentes doses (tratamentos) de UV-C: Testemunha = 0 kJ/m² (0 s); Dose 1 = 0,10 kJ/m² (28 s); Dose 2 = 0,50 kJ/m² (140 s); Dose 3 = 1,0 kJ/m² (280 s); Dose 4 = 2,0 kJ/m² (560 s); Dose 5 = 3,0 kJ/m² (840 s); Dose 6 = 4,0 kJ/m² (1120 s) e Dose 7 = 5,0 kJ/m² (1400 s). Após o tratamento as frutas foram armazenadas a temperatura de 28±2°C e 70±2% de umidade relativa por 12 dias. As barras verticais representam o erro padrão das estimativas das médias dos tratamentos.

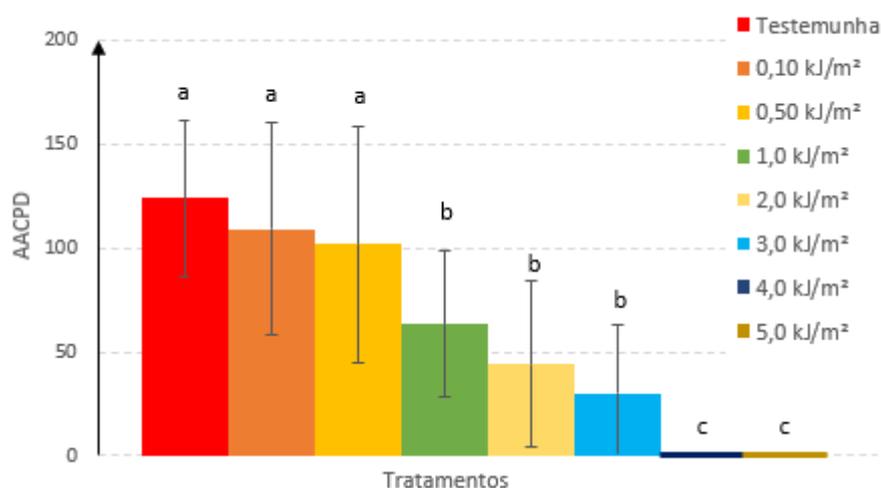


Figura 26. Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) (equação 6) para os valores do diâmetro médio da lesão (mm) de *Geotrichum citri-aurantii* em laranja ‘Lima’. Após o tratamento as frutas foram armazenadas a temperatura de $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ e $70\pm 2\%$ de umidade relativa por 12 dias. Cada coluna corresponde à média de 20 repetições. As letras diferentes acima da coluna indicam diferença significativa entre os tratamentos (Scott Knott, $p\leq 0,05$) e as barras verticais o erro padrão das estimativas das médias.

Na Figura 25 observa-se que enquanto os sintomas da podridão azeda tornaram-se evidentes na testemunha a partir do 6º dia após a inoculação, a radiação UV-C retardou o aparecimento dos sintomas em 1, 2 e 3 dias quando as frutas foram tratadas com as doses 1,0; 2,0 e 3,0 kJ/m², respectivamente. A dose 0,10 e 0,50 kJ/m² não reduziram os sintomas de *G. citri-aurantii*, não diferindo significativamente da testemunha (Figura 26). A radiação UV-C diminuiu a lesão quando as frutas foram tratadas com as doses 1,0; 2,0 e 3,0 kJ/m² (Figura 26).

Não houve incidência da podridão azeda durante os 12 dias de armazenamento quando as frutas foram tratadas com a radiação UV-C a partir de 4 kJ/m². A aplicação da radiação a partir de 4 kJ/m² reduziu em 100% a incidência da podridão azeda, controlando completamente a doença (Tabela 16). A radiação UV-C a dose de 4 kJ/m² também se mostrou eficiente no controle de *C. gloeosporioides* em uvas ‘Niágara’, sem proporcionar alterações nos atributos de cor, sólidos solúveis e acidez titulável (Cia *et al.*, 2009). A dose de UV-C de 4 kJ/m² também foi eficiente no controle de *Fusarium oxysporum* e *Alternaria alternata* em melão e na preservação dos aspectos qualitativos da fruta (Huang *et al.*, 2015). Terao *et al.* (2014, 2018) recomendaram a utilização de 2,5 kJ/m² para controle de *B. dothidea* em manga ‘Tommy’. A dose de 0,5 kJ/m² foi suficiente para o controle de *P. digitatum* em laranjas ‘Ruby’ (D’hallewin

et al., 2013) sem alterar sua aparência e qualidade. Em laranjas ‘Navel’ foi necessária a aplicação de 7,92 kJ/m² de UV-C e em laranjas ‘Valência’ a aplicação de 9 kJ/m² para controle do bolor verde (Gunduz e Pazir, 2013; Rodov *et al.*, 1992).

Existe na literatura informações sobre os efeitos biológicos e fisiológicos da radiação UV-C, bem como sobre o estímulo na produção de fitoquímicos para prolongar a vida de prateleira de frutas e estimular mecanismos de adaptação a estresses bióticos e abióticos (Urban *et al.*, 2016).

A redução da incidência da podridão azeda em laranja ‘Lima’ pode ser resultado de um fenômeno chamado hormese, que é a indução de resistência a doença por baixas doses de radiação UV-C (Luckey, 1980). Evidências experimentais indicam que baixas doses de radiação UV-C podem induzir resistência da fruta a doenças (Chalutz *et al.*, 1992). Efeitos foram relatados em maçã a dose de 7,5 kJ/m² de UV-C no controle de *P. expansum* (Capdeville *et al.*, 2002); em limão, a dose de 5 kJ/m² contra *P. digitatum* (Ben-Yehoshua *et al.*, 1992) e em morango o desenvolvimento de *Botrytis cinerea* foi reduzido a dose de 0,5 kJ/m² (Marquenie *et al.*, 2002). Charles *et al.* (2008) observaram que o tratamento de frutos de tomate pós-colheita com 3,7 kJ/m² de radiação UV-C induziu a resistência ao apodrecimento de *Botrytis cinerea*. Parte da resistência da fruta observada foi atribuída ao acúmulo de compostos fenólicos protetores, como lignina e suberina que se depositaram nas paredes celulares da epiderme da fruta e serviram como barreira contra o desenvolvimento de patógenos (Charles *et al.*, 2008).

Tabela 16. Porcentagem de controle da podridão azeda causada por *Geotrichum citri-aurantii* em laranja ‘Lima’ após os tratamentos e armazenadas a temperatura de 28±2°C e 70±2% de umidade relativa, por 12 dias.

Tratamentos (kJ/m ²)	Percentual de controle (%)
Testemunha	0
0,10	10
0,5	20
1,0	50
2,0	65
3,0	70
4,0	100
5,0	100

7.3.3. Efeito combinado do tratamento hidrotérmico e radiação UV-C no controle da podridão azeda em laranja ‘Lima’

Todos os tratamentos diferiram da testemunha, no entanto a irradiação das frutas aplicada isoladamente, apresentou eficiência superior no controle da podridão azeda que o tratamento hidrotérmico aplicado isoladamente ou combinado com a radiação (Figura 28). Na Figura 27 observa-se que a partir do 9º dia de avaliação houve um crescimento acelerado da lesão na testemunha e nos tratamentos térmicos, enquanto as frutas que foram apenas irradiadas mantiveram baixa severidade da doença até o final das avaliações.

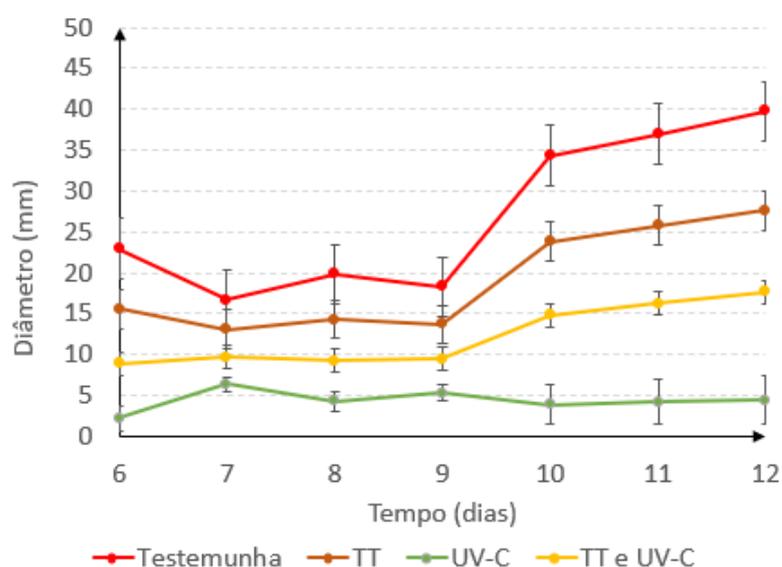


Figura 27. Curva de progresso da lesão da podridão azeda em laranja ‘Lima’, quantificada através do diâmetro médio da lesão 6 dias após as frutas terem sido tratadas e armazenadas. As frutas foram inoculadas artificialmente com *Geotrichum citri-aurantii* e receberam os seguintes tratamentos: Testemunha (frutas que não foram submetidas a nenhum tratamento), TT= Tratamento Térmico (62°C por 44 segundos), UV-C (4 kJ/m²) e TT combinado com a radiação UV-C (62°C por 44 segundos e 4 kJ/m²). As barras verticais representam o erro padrão das estimativas das médias dos tratamentos.

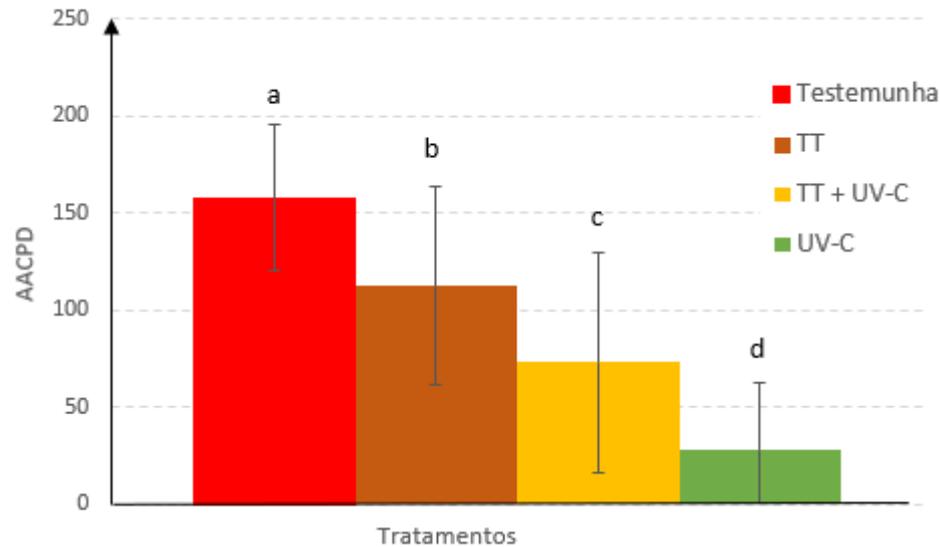


Figura 28. Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) (equação 6) para os valores do diâmetro médio da lesão (mm) de *Geotrichum citri-aurantii* em laranja ‘Lima’, durante 12 dias de avaliação. Os tratamentos avaliados foram: Testemunha (frutas que não foram submetidas a nenhum tratamento), TT = Tratamento Térmico (62°C por 44 segundos), UV-C (4 kJ/m²) e TT combinado com UV-C (62°C por 44 segundos e 4 kJ/m²), armazenadas a temperatura de 28±2°C e 70±2% de umidade relativa por 12 dias. Cada coluna corresponde à média de 20 repetições. As letras diferentes acima da coluna indicam diferença significativa entre os tratamentos (Scott Knott, p≤0,05) e as barras verticais o erro padrão das estimativas das médias.

O tratamento com radiação UV-C a 4 kJ/m² foi suficiente para controlar 85% da severidade da doença (Tabela 17). No trabalho apresentado por Terao *et al.* (2017) em laranja ‘Pêra’, o *P. digitatum* foi completamente inibido a 2 kJ/m². Então, aplicando-se a dosagem de 4 kJ/m² pode-se controlar além da podridão azeda, o bolor verde causado por *P. digitatum*, que é considerada uma das principais causadoras de perdas na pós-colheita de *citrus* (Costa *et al.*, 2021).

Tabela 17. Porcentagem de controle da podridão azeda causada por *Geotrichum citri-aurantii* em laranja ‘Lima’ após os tratamentos: TT = Tratamento Térmico (62°C por 35 segundos), UV-C (4 kJ/m²) e TT + UV-C (62°C por 44 segundos e 4 kJ/m²) armazenadas a temperatura 28±2°C e 70±2% de umidade relativa por 12 dias.

Tratamentos	Percentual de controle (%)
Testemunha	0
TT	20
UV-C	85
TT + UV-C	45

Laranjas ‘Valência’ foram tratadas contra *Guignardia citricarpa* com dose de 16 kJ/m² e demonstrou que a radiação não afetou o aspecto visual da fruta. A dose 10 kJ/m² reduziu significativamente o desenvolvimento de *P. digitatum* tanto *in vitro* quanto *in vivo* em tangerina ‘Satsuma’, sem alterar a estrutura celular do tecido (Phonyiam *et al.*, 2021). Em nossos testes preliminares observou-se, também, que até a irradiação a dose de 10 kJ/m² em laranja ‘Lima’ não causou dano visível na epiderme da fruta. A laranja ‘Lima’ demonstrou ser bastante tolerante à radiação UV-C.

No primeiro experimento avaliando a radiação UV-C individualmente obteve-se 100% de controle da doença e no experimento do ensaio combinado obteve-se um controle de 85%. Vários fatores podem ter contribuído para a diferença de controle entre os experimentos, como o clima no momento da colheita, a época de colheita e o ponto de maturação (D’hallewin *et al.*, 2000; Kuniga *et al.*, 2006). Droby *et al.* (1993) observaram que a época de colheita de laranjas ‘Toranta’ influencia na resistência induzida por UV-C contra *P. digitatum*. A dose inicial de UV-C necessária em frutas colhidas em novembro para resposta máxima foi de 4,8 kJ/m². Caiu para 1,6 e 3,2 kJ/m² nas frutas colhidas em dezembro e janeiro, respectivamente, e aumentou para 8 kJ/m² em frutas colhidas em fevereiro.

7.4 CONCLUSÃO

O tratamento hidrotérmico pela imersão das laranjas ‘Lima’ em água quente não controlou a severidade da podridão azeda causada por *G. citri-aurantii*. Temperaturas acima de 70°C aumentaram a severidade da doença além de causar escaldadura na epiderme da fruta. Os resultados demonstraram que o tratamento a 62°C por 44 segundos apesar de não controlar a doença, diminuiu significativamente a severidade. Enquanto que a radiação UV-C na dose de

4 kJ/m² inibiu totalmente a infecção do patógeno, apresentando-se como uma alternativa promissora no controle de *G. citri-aurantii* na pós-colheita em laranjas 'Lima'.

8. CAPÍTULO IV: ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS: EFEITO DO TRATAMENTO COM RADIAÇÃO UV-C NOS ASPECTOS QUALITATIVOS DA LARANJA ‘LIMA’ PÓS COLHEITA

8.1. RESUMO

Neste último capítulo avaliou-se o efeito do tratamento com radiação UV-C a dose de 4 kJ/m² nos aspectos qualitativos da laranja ‘Lima’ tratada através dos seguintes parâmetros físico-químicos: cor da epiderme da fruta, firmeza (F), sólidos solúveis (SS), acidez total titulável (AT) e pH. Laranjas ‘Lima’ previamente desinfestadas foram separadas em dois lotes: em um lote as frutas foram irradiadas e no outro as frutas não receberam nenhum tratamento, constituindo a testemunha. Em seguida foram armazenadas a temperatura ambiente de 23±2°C e umidade relativa de 50±2% e posteriormente avaliadas após 1,5 e 10 dias de armazenamento. Apesar de não se observar alterações significativas nos parâmetros de cor durante os 10 dias de armazenamento, observou-se que as laranjas mantiveram-se brilhantes e firmes durante o período de avaliação, indicando a manutenção da qualidade das frutas tratadas. O pH e o SS apresentaram diferença significativa em relação a testemunha no 1º e 5º dia de armazenamento, e a AT somente no 5º dia, mas de modo geral não houve diminuição ou aumento desses valores durante o período de armazenamento. A firmeza apresentou diferença significativa no 10º dia de armazenamento, sendo o valor das frutas tratadas com a radiação UV-C maior do que a testemunha. Os resultados indicam que o tratamento com radiação UV-C a 4 kJ/m² além de controlar o patógeno mantém a qualidade da laranja, preservando a firmeza e retardando o processo de senescência.

Palavras-chave: qualidade, análises físico-químicas, *Citrus* spp.

8.2. MATERIAL E MÉTODOS

Conforme apresentado nos capítulos anteriores, a radiação UV-C a 4 kJ/m² foi o tratamento que mostrou maior eficiência no controle do *G. citri-aurantii*. Assim, neste capítulo analisou-se o efeito desse tratamento nos atributos de qualidade da laranja.

Realizou-se a análise de cor no laboratório de pós-colheita da FEAGRI (Faculdade de Engenharia Agrícola) da UNICAMP, em Campinas, SP e as demais análises no laboratório de Microbiologia (LMA) da Embrapa Meio Ambiente, em Jaguariúna, SP.

8.2.1. Preparo das frutas e aplicação da radiação UV-C

Laranjas ‘Lima’ coletadas e selecionadas no produtor foram encaminhadas ao LMA, onde foram lavadas e desinfestadas. No experimento foram avaliados dois tratamentos: testemunha e radiação UV-C a dose de 4 kJ/m². Após os tratamentos, as frutas foram colocadas em caixas plásticas e mantidas em temperatura ambiente a 23±2°C e umidade relativa de 50±2%. As avaliações ocorreram na chegada das frutas ao laboratório e após 1, 5 e 10 dias de armazenamento. Coletando aleatoriamente 20 frutas irradiadas e 20 sem nenhum tratamento. Avaliaram-se os seguintes atributos de qualidade de cada fruta: firmeza (F), sólidos solúveis totais (SS), acidez total titulável (AT), pH e cor.

Firmeza: Um texturômetro (TA.XTExpress, Stable Micro Systems, Reino Unido), com probe de 35 mm, velocidade de 2 mm/s e compressão de 10 mm, foi utilizado para medir a força de compressão de uma sonda plana sobre a região equatorial de uma laranja ‘Lima’. A leitura foi expressa em Newton (N).

Qualidade do suco: Foi extraído o suco da fruta peneirado e disposto em copos plásticos. Os teores de SS, AT e pH foram determinados conforme o método oficial de análise da AOAC (2012) utilizando-se uma amostra do suco da fruta. Os sólidos solúveis expressos em °Brix foram medidos com auxílio do refratômetro SR SENSOR com temperatura padrão de 20°C. O pH com o pHmetro de bancada (modelo Q4088AS, Quimib). A acidez titulável foi determinada diluindo-se 10 mL do suco em 90 mL de água destilada, com 5 gotas do indicador Fenolftaleína 1%. Titulou-se com o NaOH 0,1 N até o ponto de inflexão. Utilizou-se a equação 9 para determinar a AT. O resultado foi expresso em grama (g) de ácido cítrico.

$$AT = \frac{mLNaOHxNxEqgramadoácidopredominantex100xFatordecorreção}{mLdaamostrax1000} \quad (9)$$

Onde: mL NaOH = volume gasto na titulação com NaOH; N = normalidade da solução NaOH (0,1 N); Eq grama do ácido predominante (ácido cítrico: 64); Fator de correção = 0,983494; mL da amostra = 10 mL. O fator de correção foi determinado padronizando a solução de NaOH com biftalano de potássio (Massa molar = 204,22 g/mol).

Cor da epiderme da fruta: Em cada dia de avaliação foram analisadas 20 frutas de cada tratamento. A cor da epiderme da fruta foi avaliada com auxílio do Colorímetro Minolta (modelo CM-700d/600d; Konica Minolta, Japão), utilizando-se a escala de cor CIE (1976) $L^*a^*b^*$ em que L^* indica luminosidade (100 indica branco e 0 indica preto, ou seja, quão claro ou escuro é o produto), a^* (intensidade do vermelho $+a^*$ ao verde $-a^*$) e o b^* (intensidade do amarelo $+b^*$ ao azul $-b^*$). Tomando-se cinco leituras na região equatorial em cada fruta. Antes das medições o Colorímetro foi calibrado usando uma placa branca padrão. As medições utilizando-se os valores isolados das coordenadas a^* b^* , não são adequadas, visto que são coordenadas dependentes (Guimarães, 2004). Então, nas análises de cor utilizou-se o modelo CIE $L^*c^*h^*$, onde c^* (croma) (equação 10) é a relação entre as coordenadas cromáticas (a^* b^*) e o h^* (ângulo hue) (equação 11) (Anexo II), forma o ângulo entre a^* e b^* . O valor de L^* é o mesmo utilizado nas coordenadas $L^*a^*b^*$. As coordenadas do c^* e h^* foram obtidas através do modelo $L^*a^*b^*$, utilizando as equações 10 e 11:

$$c^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \quad (10)$$

$$h^* = \tan^{-1} \left(\frac{b^*}{a^*} \right) \quad (11)$$

8.2.2. Análise estatística

A análise dos resultados foi realizada no Software SAS (versão 9.2, SAS Institute, Cary, EUA). A ANOVA, seguida pelo teste de F ($p \leq 0,05$) foi utilizada para testar a hipótese de que as médias entre os tratamentos são diferentes.

8.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos atributos de qualidade de laranjas ‘Lima’ submetidas ao tratamento com radiação UV-C a 4 kJ/m² estão descritos na Tabela 18.

Tabela 18. Resultados das médias e desvio padrão dos atributos de qualidade de laranjas ‘Lima’ submetidas ao tratamento com radiação UV-C (4 kJ/m²) e armazenadas a temperatura ambiente (23±2°C).

Atributos de qualidade	Tratamento	Chegada		1 dia após o tratamento		5 dias após o tratamento		10 dias após o tratamento	
		Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
AT (%)	Testemunha	0,099	a 0,003	0,087	a 0,003	0,085	a 0,002	0,085	a 0,002
	UV-C	0,098	a 0,003	0,087	a 0,003	0,078	b 0,002	0,081	a 0,002
pH	Testemunha	5,701	a 0,035	5,883	a 0,024	5,908	a 0,018	5,840	a 0,021
	UV-C	5,658	a 0,035	5,740	b 0,024	5,982	b 0,018	5,827	a 0,021
SS (%)	Testemunha	11,105	a 0,378	11,585	a 0,318	10,975	a 0,412	11,255	a 0,356
	UV-C	11,240	a 0,378	10,380	b 0,318	9,565	b 0,412	10,400	a 0,356
F (N)	Testemunha	46,534	a 1,781	39,422	a 1,660	29,986	a 2,123	26,381	a 1,729
	UV-C	46,768	a 1,781	40,276	a 1,660	34,644	a 2,123	32,804	b 1,729
Cor									
L*	Testemunha	61,269	a 0,467	57,152	a 1,250	61,703	a 0,683	61,366	a 0,674
	UV-C	61,158	a 0,467	62,300	b 1,250	61,649	a 0,683	59,959	a 0,674
c*	Testemunha	59,129	a 1,005	57,499	a 1,420	60,614	a 1,010	60,115	a 1,183
	UV-C	58,451	a 1,005	60,012	a 1,420	60,464	a 1,010	57,706	a 1,183
h*	Testemunha	73,661	a 1,936	74,814	a 1,704	74,875	a 1,645	74,913	a 1,695
	UV-C	72,806	a 1,936	74,613	a 1,704	73,674	a 1,645	73,503	a 1,695

DP = Desvio padrão

As médias seguidas pelas mesmas letras não foram significativas pelo teste de Fisher ($p \leq 0,05$)
 AT= acidez total titulável; SS= sólidos solúveis totais; F= firmeza; L*= luminosidade;
 c*= croma; h*= ângulo hue

A cor da epiderme da fruta é um dos atributos de qualidade mais importantes das frutas cítricas para a aceitação do consumidor, sendo resultado dos pigmentos clorofilas, carotenóides e antocianinas (Habibi *et al.* 2021). Em relação ao atributo cor, pode-se observar, através da Tabela 18, que de um modo geral durante os 10 dias de armazenamento, não houve diminuição significativa nos valores das coordenadas de cor L*c*h*, observando-se que as frutas irradiadas mantiveram a coloração clara, brilhante e alaranjada.

Analisando-se os parâmetros de cor individualmente, as amostras de laranja ‘Lima’ irradiadas, apesar de não apresentarem variações importantes no parâmetro L* (luminosidade) durante os 10 dias de armazenamento (Tabela 18), enquanto as amostras testemunhas apresentaram uma tendência de redução no valor de L* nos primeiros dias de armazenamento,

as frutas irradiadas mantiveram-se com os valores constantes até o 5º dia, indicando que as laranjas mantiveram o brilho durante todo o período de armazenamento. Quanto aos parâmetros c^* e h^* , apesar de não apresentarem diferenças significativas entre os tratamentos, observou-se uma tendência de aumento para a testemunha, e de redução para as frutas irradiadas, indicando a manutenção dos aspectos qualitativos da fruta (Figura 29 E, F, G).

Laranjas ‘Ruby’ foram irradiadas com as doses 0,5 kJ/m², 1,5 kJ/m² e 3,0 kJ/m². Apenas a irradiação UV-C na dose de 3,0 kJ/m² alterou a cor da laranja em comparação com a fruta não tratada. No entanto, mesmo com essa alta taxa de tratamento, o UV-C não alterou o teor de sólidos solúveis e acidez total titulável (D’hallewin *et al.*, 2000).

A firmeza é outro aspecto qualitativo importante para a aceitabilidade do consumidor. Frutas que receberam a radiação UV-C apresentaram maior valor de firmeza (32,80 N), comparado a testemunha (26,38), aos 10 dias de armazenamento, diferindo estatisticamente entre si. Na Figura 29-D, observa-se uma tendência de queda mais acentuada na textura em frutas da testemunha, que em frutas irradiadas. Esse resultado também foi perceptível ao tato, quando as laranjas tratadas com UV-C aparentavam estarem mais firmes do que a testemunha, em que as frutas se mostraram com a aparência menos firme, já a partir do 5º dia de armazenamento. Resultados semelhantes foram obtidos por Araque *et al.* (2018), nos quais a exposição a baixa dose de UV-C (4 kJ/m²) em morangos, armazenados por 4 dias, preservou a firmeza sem alterar suas características físico-químicas, mostrando que a radiação protegeu a fruta contra a perda de umidade. Cerejas irradiadas com 3 kJ/m² de UV-C apresentaram maior resistência em sua epiderme, preservando a textura da fruta (Michailidis *et al.*, 2019).

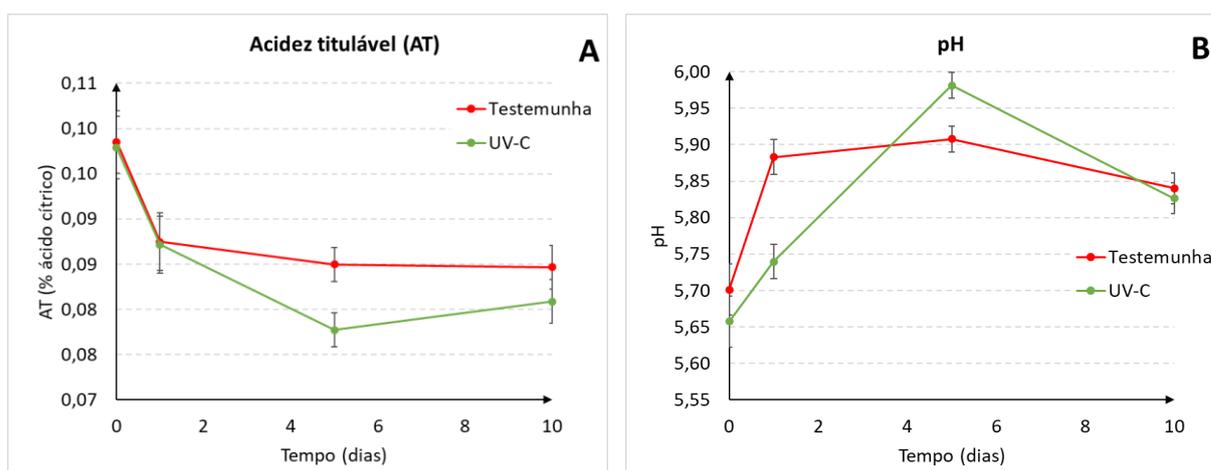
A qualidade do suco é influenciada por fatores microbiológicos, físicos, químicos e alterações nessas características influenciam a vida de prateleira da laranja. O pH, sólidos solúveis e acidez titulável são parâmetros relacionados com a maturação da fruta (Habibi *et al.*, 2021).

O SS indica quanto de açúcares encontra-se dissolvido no suco. Na laranja 80% de seu SS são açúcares (principalmente sacarose, glicose e frutose) e 10% de ácidos orgânicos (principalmente ácido cítrico) (Lado *et al.*, 2014). O pH e os sólidos solúveis apresentaram, apesar de sutis, diferenças significativas no 1º e 5º dia de armazenamento, sendo que o pH se apresentou menor no primeiro dia e ligeiramente maior que na testemunha no 5º dia, enquanto que, com relação aos SS, as frutas tratadas apresentaram valores significativamente menores que a testemunha no primeiro e quinto dia de armazenamento. Observa-se na Figura 28 C, que

durante todo o período de armazenamento o teor de SS manteve valores mais elevados que a testemunha. Esses resultados sugerem que a irradiação UV-C promoveu uma desaceleração no processo de maturação das frutas. A conversão de ácidos orgânicos em açúcares por enzimas glicolíticas pode aumentar o SS (Rapisarda *et al.*, 2008). Laranjas irradiadas apresentaram menor acidez titulável que a testemunha no 5º dia de armazenamento. O aumento do pH do suco de frutas pode ser indicativo do consumo de ácidos orgânicos durante o armazenamento (Habibi *et al.*, 2021).

O tratamento com radiação UV-C a dose de 3,94 kJ/m² também não causou alterações significativas no pH, SS, cor e acidez titulável de laranja ‘Toranta’ (*Citrus paradisi*) após o tratamento com UV-C e a qualidade microbiológica foi mantida por 10 dias (Cava *et al.*, 2015). Mangas ‘Chokanan’ também não apresentaram alterações significativas após tratamento com UV-C por 60 minutos (Santhirasegaram *et al.*, 2015). E a utilização de radiação UV-C a dose 0,53 kJ/m² em morangos não levou a perda de qualidade da fruta (Nardello *et al.*, 2021).

A radiação UV-C demonstrou ser uma alternativa ao uso de fungicidas, apresentando elevada eficiência no controle de podridão azeda causada por *G. citri-aurantii* na pós-colheita em laranja ‘Lima’.



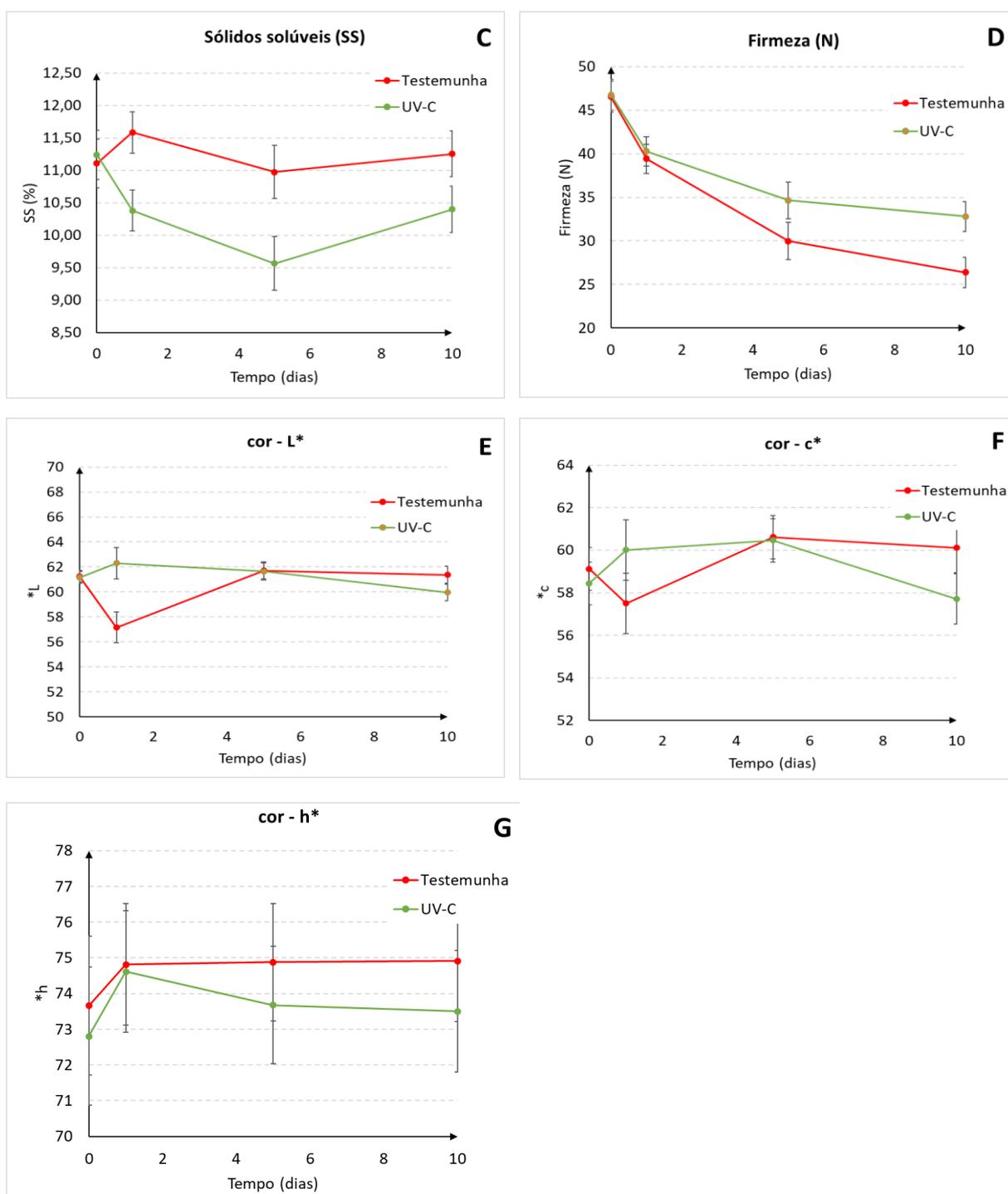


Figura 29. Resultado das análises dos atributos de qualidade: A) Acidez total; B) pH; C) sólidos solúveis; D) Firmeza; E) parâmetro de cor L*; F) parâmetro de cor c*; G) parâmetro de cor h* e laranjas ‘Lima’ submetidas a radiação UV-C (4 kJ/m²) e armazenadas a temperatura ambiente, a 23±2°C.

8.4. CONCLUSÃO

A radiação UV-C a 4 kJ/m² não proporcionou alteração significativa nos parâmetros físico-químicos qualitativos (pH, acidez total, sólidos solúveis, firmeza, cor), de laranjas ‘Lima’ durante os 10 dias de armazenamento.

O tratamento com radiação UV-C preservou a firmeza da laranja, quando comparado a testemunha, e retardou o processo de amadurecimento, demonstrado em menores valores de SS e pela manutenção dos parâmetros de cor.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adaskaveg, J., Foster, H. New Developments in Postharvest Fungicide Registrations for Edible Horticultural Crops and Use Strategies in the United States. **Post-harvest Pathology**, 2009.

Aggarwal, D. *et al.*, Chapter 2: Systems approaches for postharvest handling of fresh produce. Postharvest Handling: A Systems Approach. **Academic Press**, 4^a ed, 2022.

Ahmed, F.A *et al.* Post-harvest disease of tomato and natural products for disease management. **African Journal of Agricultural Research**, p. 684-691, 2017.

Alam, M.W. *et al.* First Report of *Geotrichum candidum* Causing Postharvest Sour Rot of Peach in Punjab, Pakistan. **Plant disease**, mai. 2017.

Alamar, M.C. *et al.* Minimising food waste: a call for multidisciplinary research. *Journal of Science & Food Agriculture*, 2018.

Alfenas, A.C. *et al.* Isolamento de fungos fitopatogênicos. **Métodos em Fitopatologia**, Editora UFV, 1^aed, 2007.

Aloizou, A.M. *et al.* Pesticides, cognitive functions and dementia: A review. **Toxicology Letters**, jun. 2020.

Alonzo, G. *et al.* First Report of Sour Rot of Strawberry Caused by *Geotrichum candidum* in the United States. **Plant disease**, nov. 2020.

Alves, P.R.B.; Melo, B. Cultura dos citros. Disponível em:<
<https://pt.scribd.com/document/221391454/Cultura-dos-Citros-Alves-P-R-B-e-Melo-B-pdf>>.
Acesso em 28 de mar. 2022.

Amorim, L. *et al.* Stone fruit injuries and damage at the wholesale market of São Paulo, Brazil. **Postharvest Biology and Technology**, v. 47, p. 353-357, mar. 2008.

Anjos, V.D.A. *et al.* Influência de tratamento térmico e sistemas de embalagens na qualidade de lichia 'Bengal. **Revista Brasileira de Fruticultura**, dez. 2014.

Anuário Brasileiro de Horti e Fruti 2021 (2021). Brazilian Horti e Fruit Yearbook. **Editora Gazeta**, Santa Cruz do Sul, RS, Brasil. Disponível em: <

https://www.editoragazeta.com.br/sitewp/wpcontent/uploads/2021/04/HORTIFRUTI_2021.pdf>. Acesso em: 03 de nov. de 2021.

AOAC. Official methods of analysis, **Association of Official Analytical Chemists** 2012.

Aragaki, M. Limitations of Hot Water Treatment in the Control of Phytophthora Fruit Rot of Papaya. **Plant Pathologist**, 1981.

Araque, L.C.O. *et al.* Cyclic low dose UV-C treatments retain strawberry fruit quality more effectively than conventional pre-storage single high fluence applications. **LWT**, v. 92, p. 304-311, 2018.

Asrey, R., Das. A. Effect of pre-harvest practices on postharvest quality and diseases of fruits. *Postharvest Handling and Diseases of Horticultural Produce*. **CRC Press Taylor and Francis Groups**, p. 25-31, 2021.

Assis, J.P. *et al.* Glossário de estatística. **Editora Edufersa**, 2019.

Baral, S. *et al.* Economics of production and marketing of mandarin in Parbat and Baglung districts of Nepal. **International Journal of Agriculture, Environment and Food Sciences**, 2021.

Barbará, M.A. *et al.* Refrigeração e cera na qualidade pós-colheita da tangerina ‘Fremont’. **Citrus Research & Technology**, 2020.

Barnett, H.L., Hunter, B.B. Illustrated genera of imperfect fungi. Burgess **Publishing Company**, 3^aed, 1972.

Barros, H.R.M. *et al.* Antioxidant capacity and mineral content of pulp and peel from commercial cultivars of citrus from Brazil. **Food Chemistry**, v. 134, p. 1892-1898, 2012.

Bassetto, E. *et al.* Efeito da irradiação UV-C no controle da podridão parda (*Monilinia fructicola*) e da podridão mole (*Rhizopus stolonifer*) em pós-colheita de pêssegos. **Fitopatologia Brasileira**, out. 2007.

Bastos, C.N. Efeito do óleo de Piper aduncum sobre Crinipelis e outros fungos fitopatogênicos. **Fitopatologia Brasileira**, 1997.

Batt, P.J. Fulfilling customer needs in agribusiness supply chains. **Acta Horticulturae**, v. 699, p. 83-89, 2006.

Baudoin, A.B.A.M.; Eckert, J.W. Factors, influencing the susceptibility of lemons to infection by *Geotrichum candidum*. **Postharvest Pathology and Myxotoxins**, 1982.

Bazioli, J.M. *et al.* Biological Control of Citrus Postharvest Phytopathogens. **Toxins**, jul. 2019.

Belsky, J.; Joshi, N.K. Effects of Fungicide and Herbicide Chemical Exposure on Apis and Non-Apis Bees in Agricultural Landscape. **Frontiers in Environmental Science**, jul. 2020.

Benato, E.A. *et al.* Óleos essenciais e tratamento térmico no controle pós-colheita de bolor verde em laranja. **Summa phytopathologica**, 2018.

Besten, H.W.W., *et al.*, M.H. Natural Diversity in Heat Resistance of Bacteria and Bacterial Spores: Impact on Food Safety and Quality. **Annual Review of Food Science and Technology**, v.9, p. 383-410, 2018.

Box e Wilson. On the Experimental Attainment of Optimum Conditions. **Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)**, v. 13, p. 1-45, 1951.

Brandão, L.T.D. *et al.* Protocolo de Extração de DNA Genômico para os Principais Fungos Fitopatogênicos do Arroz. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, **Embrapa Arroz e Feijão**, Santo Antônio de Goiás, GO, 2019.

Qiagen. **DNeasy® UltraClean® Microbial Kit Handbook**, Sample to Insight, 2020.

Brazilian Horti & Fruit Yearbook 2021 (2021) Editora Gazeta Santa Cruz, Santa Cruz, RS, Brazil. 104p. Disponível em: <https://www.editoragazeta.com.br/sitewp/wp-content/uploads/2021/04/HORTIFRUTI_2021.pdf>. Acesso em: 12 de dez 2021.

Buenos, A.A. *et al.* Metodologia da superfície de resposta aplicada à medição de tensões em chapas. **VI Congresso nacional de engenharia mecânica**, Campina Grande – Paraíba – Brasil, 2010.

Buralli, R.J. *et al.* Respiratory Condition of Family Farmers Exposed to Pesticides in the State of Rio de Janeiro, Brazil. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, 2018.

Butler, E. *et al.* *Galactomyces citri-aurantii* a newly found teleomorph of *Geotrichum citri-aurantii*--the cause of sour rot of citrus fruit. **Mycotaxon**, 1988.

Ben-Yehoshua, S. *et al.* Preformed and induced antifungal materials of citrus fruits in relation to the enhancement of decay resistance by heat and ultraviolet treatments. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 1992.

Capdeville, G. *et al.* Alternative disease control agents induce resistance to blue mold in harvested 'red delicious' apple fruit. **Phytopathology**, p. 900-908, 2002.

Camilli, E.C. *et al.* Avaliação de agentes bióticos e abióticos aplicados em pós-colheita na proteção de uva 'Itália' contra *Botrytis cinerea*. Dissertação de mestrado, Faculdade de ciências agrônômicas da UNESP, Botucatu, 2004.

Campbell, C.L., Madden, L.V. Introduction to Plant **Disease Epidemiology**, 1990.

Canale, M.C. *et al.* *In vitro* effect of UV-C irradiation on *Guignardia citricarpa* and on postharvest control of citrus black spot. **Tropical Plant Pathology**, dez, 2011.

Cava, E.L.L. *et al.* Evolution during refrigerated storage of bioactive compounds and quality characteristics of grapefruit [*Citrus paradisi* (Macf.)] juice treated with UV-C light. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, p. 1325-1333, 2015.

Cavicchioli, A.; Gutz, I.G.R. O uso de radiação ultravioleta para o pré-tratamento de amostras em análise inorgânica. **Química Nova**, 2003.

Cavicchioli, A.; Gutz, I.G.R. O uso de radiação ultravioleta para o pré-tratamento de amostras em análise inorgânica. **Química Nova**, 2003.

CEAGESP. Conheça os benefícios da laranja lima. Disponível em: <<https://ceagesp.gov.br/comunicacao/noticias/conheca-os-beneficios-da-laranja-lima-o-produto-destaque-da-semana-75/>>. Acesso em: 01 de jan. de 2022.

Celano, R. *et al.* Characterisation of nutraceutical compounds from different parts of particular species of *Citrus sinensis* 'Ovale Calabrese' by UHPLC-UV-ESI-HRMS. **Natural Product Research**, 2019.

Chalutz, E. *et al.* UV-induced resistance to postharvest diseases of citrus fruit. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 15, p. 367-371, 1992.

Chalupowicz, D. *et al.* The Potential Use of Hot Water Rinsing and Brushing Technology to Extend Storability and Shelf Life of Sweet Acorn Squash (*Cucurbita pepo* L.). **Horticulturae**, 2018.

Charles, M.T. *et al.* Physiological basis of UV-C induced resistance to *Botrytis cinerea* in tomato fruit, III Ultrastructural modifications and their impact on fungal colonization. **Postharvest Biology and Technology**, 2008.

Chávez-González, M.L. *et al.* Essential Oils: A Natural Alternative to Combat Antibiotics Resistance. **Antibiotic Resistance**, p. 227-237, 2016.

Chen, C. *et al.* Clove Essential Oil as an Alternative Approach to Control Postharvest Blue Mold Caused by *Penicillium italicum* in Citrus Fruit. **Biomolecules**, 2019.

Chen, D.; Förster, H.; Adaskaveg, J.E. Natamycin, a Biofungicide for Managing Major Postharvest Fruit Decays of Citrus. **Plant disease**, 2021.

Cheng, H. *et al.* First Report of *Geotrichum candidum* Causing Postharvest Sour Rot on Kiwifruits in China. **Plant disease**, abr. 2021.

Cheng, X. *et al.* Inhibitory mechanisms of cinnamic acid on the growth of *Geotrichum citri-aurantii*. **Food control**, v. 131, jan. 2022.

Chitarra, M.I.F, Chitarra, A.B. Pós-colheita de frutas e hortaliças. Fisiologia e manuseio. **Editores UFLA**, Lavras, Minas Gerais, Brasil, p. 161-201, 2005.

Cia, P. *et al.* Effects of gamma and UV-C irradiation on the postharvest control of papaya anthracnose. **Postharvest Biology and Technology**, v. 43, p. 366-373, 2007.

Cia, P. *et al.* Radiação ultravioleta no controle pós-colheita de *Colletotrichum Gloeosporioides* em uva 'Niagara rosada'. **Bragantia**, Campinas, 2009.

Cohen, E. Predisposition of citrus fruits to sour rot When submerged in water. **Plant disease**, 1991.

Commission implementing regulation (eu) 2018/1865. **Official Journal of the European Union** (2018). Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg_impl/2018/1865/oj>. Acesso em: 20 de dez. de 2021.

Costa, J.H. *et al.* *Penicillium digitatum* infection mechanisms in citrus: What do we know so far?. **Fungal Biology**, v. 123, p. 584-593, 2019.

Couto, M.A.L., Brazaca, S.G.C. Quantificação de vitamina C e capacidade antioxidante de variedades cítricas. **Ciência e Tecnologia das Alimentos**, 2010.

Cunha, T. Potencial de leveduras isoladas do solo e do filoplano de plantas cítricas no biocontrole de doenças de pós-colheita de citros (Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agropecuária). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2013.

D’Aquino, S. *et al.* Residue levels and efficacy of fludioxonil and thiabendazole in controlling postharvest green mold decay in citrus fruit when applied in combination with sodium bicarbonate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2013.

Darré, M. *et al.* Postharvest Ultraviolet Radiation in Fruit and Vegetables: Applications and Factors Modulating Its Efficacy on Bioactive Compounds and Microbial Growth. **Foods**, fev. 2022.

Delorme, M.M. *et al.* Ultraviolet radiation: An interesting technology to preserve quality and safety of milk and dairy foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 102, p. 146-155, 2020.

Diao, E. *et al.* Ultraviolet irradiation detoxification of aflatoxins. **Trends in Food Science & Technology**, v.42, p. 64-69, 2017 digitatum and to control citrus green mold after Harvest. **Postharvest Biology and Technology**, 2006.

Djekic, I., *et al.* Quality perception throughout the apple fruit chain. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 13, p. 3106-3118, 2019.

Domingues, E.T. Caracterização morfológica, agronômica, isoenzimática e por RAPD de variedades de laranja doce - *citrus senensis L. osbeck*. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1998.

Doyle, J. DNA protocols for plants. **Molecular Techniques in Taxonomy**, 1991.

Du, H. *et al.* *Candida auris*: Epidemiology, biology, antifungal resistance, and virulence. **Plos Pathogens**, 2020.

D'hallewin, G. *et al.* Ultraviolet C Irradiation at 0.5 kJ·m⁻² Reduces Decay without Causing Damage or Affecting Postharvest Quality of Star Ruby Grapefruit (*C. paradisi* Macf.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2000.

Droby, S. *et al.* Factors affecting UV-induced resistance in grapefruit against the green mould decay caused by *Penicillium digitatum*. **Plant pathology**, 1993.

El-Sayed, A., Kamel, M. Climatic changes and their role in emergence and re-emergence of diseases. **Environmental Science and Pollution Research**, 2020.

Eo, J.K. *et al.* *Galactomyces pseudocandidus* (Dipodascaceae): An Unrecorded Yeast-like Fungus Isolated from the Digestive Tract of *Procambarus clarkii*. *The Korean Journal of Mycology*, 2021.

Eschionato, R.A. *et al.* Ação da temperatura no controle de fungos causados de doenças pós-colheita em mamão. **11º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2017**, Campinas, SP, 2017.

Evangelou, E. *et al.* Exposure to pesticides and diabetes: A systematic review and meta-analysis. **Environment International**, v. 91, p.60-68, mai. 2016.

Fabi, C. *et al.* Improving data on food losses and waste: From theory to practice. **Food policy**, 2021.

FAC. List of first confirmed cases of plant pathogenic organism resistant to disease control agentes (2020). Disponível em:< https://www.frac.info/docs/default-source/publications/list-of-resistant-plant-pathogens/list-of-first-confirmed-cases-of-plant-pathogenic-organisms-resistant-to-disease-control-agents_05_2020.pdf?sfvrsn=7073499a_2>. Acesso em: 01 de fev. 2022.

Fallik, E. Prestorage hot water treatments (immersion, rinsing and brushing). **Postharvest Biology and Technology**, v. 32, p. 125-134, 2004.

Fallik, E., Elic, Z. Chapter 20 - Mitigating contamination of fresh and fresh-cut produce. **Postharvest Handling**, 4^aed, p. 621-649. 2022.

Fallik, E., *et al.* D. Hot Water Rinsing and Brushing of Fresh Produce as an Alternative to Chemical Treatment after Harvest—The Story behind the Technology. **Agronomy**, 2021.

Fan, X. Huang, R., Chen, H. Application of ultraviolet C technology for surface decontamination of fresh produce. **Trends in Food Science & Technology**, dez. 2017.

FAO. Food and Agriculture Organization, Global food losses and food waste (2011). Disponível em: <<https://www.fao.org/3/i2697e/i2697e.pdf>>. Acesso em: 28 de jan. 2022.

Fernandez, M. R. Manual para laboratório de fitopatologia. **Centro nacional de pesquisa de trigo**, Embrapa, Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil, 1993.

Fernando, I. *et al.* Measurement and analysis of vibration and mechanical damage to bananas during long-distance interstate transport by multi-trailer road trains. *Postharvest Biology and Technology*, v. 158, 2019.

Ferraz, L.P. *et al.* Biocontrol ability and putative mode of action of yeasts against *Geotrichum citri-aurantii* in citrus fruit. **Microbiological Research**, v. 188, p. 72-79, 2016.

Ferreira, D. SISVAR: A computer analysis system to fixed effects split plot type designs. *Revista brasileira de biometria*, v. 37, n. 4, p. 529-535, dec. 2019. ISSN 1983-0823. Disponível em: <<http://www.biometria.ufla.br/index.php/BBJ/article/view/450>>. Acesso em: 17 de fev. 2022.

Ferreira, M.D., Spicigo, P.C. Capítulo I: Colorimetria - princípios e aplicações na agricultura. Análises não destrutivas. **Instrumentação pós-colheita em frutas e hortaliças**, Embrapa Instrumentação, São Carlos, p. 209-220, 2017.

Fischer, I.H. *et al.* Doenças pós-colheita em laranja 'Pêra' produzida em sistema orgânico econvencional e resistência de *Penicillium digitatum* a fungicidas. **Summa phytopathol**, 2013.

Fisher, M.C. *et al.* Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security. **Science**, v.360, p. 739-742, 2018.

Flanagan, K. *et al.* Reducing Food Loss and Waste: Setting a Global Action Agenda (2019). World Resources Institute. Disponível em: <<https://www.wri.org/research/reducing-food-loss-and-waste-setting-global-action-agenda>>. Acesso em: 28 de jan. 2022.

Forsberg, K. *et al.* *Candida auris*: The recent emergence of a multidrug-resistant fungal pathogen. **Medical Mycology**, 2019.

Forsyth, J., Damiani, J. CITRUS FRUITS | Types on the Market. **Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition**, 2^aed, p. 1329-1335, 2003.

Frossard, P. *et al.* Etude des traitements fongicides appliqués aux bananes après récolte. Iii. Action de l'Imazalil. **Fruits**, 1977.

Gabriel, A.A., *et al.* Utility of UV-C radiation as anti-Salmonella decontamination treatment for desiccated coconut flakes. **Food Control**, v.71, p. 117-123, 2017.

Gao, J. *et al.* The synergistic effect of scolymus maculatus l. plant extracts and hot water dipping on the postharvest storability of valencia oranges. **Pakistan Journal of Botany**, 2021.

Garcia, J.F. *et al.* Decay incidence and quality of different citrus varieties after postharvest heat treatment at laboratory and industrial scale. **Postharvest Biology and Technology**, v. 118, p.96-102, 2016.

González-Estrada, R. *et al.* Chapter 5 - Alternative management technologies for postharvest disease control. Food Losses, Sustainable **Postharvest and Food Technologies**, p.153-190, 2021.

Grimmer, MK. Fungicide resistance risk assessment based on traits associated with the rate of pathogen Evolution. **Pest management Science**, v.71, p.207-215, 2015.

Guimarães, L. A cor como informação: a construção. **Anablume**, 3^a ed., 2004.

Gunduz, G. T., Pazir, F. Inactivation of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* under in vitro and in vivo conditions by using UV-C light. **Journal of Food Protection**, 2013.

Gunasegaran, B. *et al.* Morphological identification and in vitro evaluation of *Colletotrichum gloeosporioides* in 'Chok Anan' mango using UV-C irradiation. **Acta Horticulturae**, 2018.

Gusella, G. *et al.* Unusual Stylar-End Breakdown and Sour Rot on Key Lime (*Citrus aurantiifolia*) in Pre-Harvest Condition in Italy. **Plants**, 2021.

Halfeld-Vieira, B.A, Terao, D. Nechet, K.L. First Report of *Geotrichum candidum* Causing Sour-Rot of Melon in Brazil. **Plant disease**, mar. 2020.

Hall, B.G. Building Phylogenetic Trees from Molecular Data with MEGA. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, p. 1229-1235, 2013.

Han, X. *et al.* Exposure to organochlorine pesticides and the risk of type 2 diabetes in the population of East China. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 2020.

Harder, M.N.C. *et al.* Avaliação quantitativa por colorímetro digital da cor do ovo de galinhas poedeiras alimentadas com urucum (*Bixa orellana*). **Revista Portuguesa De Ciências Veterinárias.**, 2007.

Harding, P.R. Differential sensitivity to sodium orthophenylphenate by biphenyl-sensitive and biphenyl-resistant strains of *Penicillium digitatum*. **Plant disease repórter**, v. 46, 1962.

Hassan, A.B. *et al.* Effect of UV-C radiation treatment on microbial load and antioxidant capacity in hot pepper, fennel and coriander. **LWT**, v. 134, dez. 2020.

Hernandez-Mariano, J.A. *et al.* Exposure to the pesticide DDT and risk of diabetes and hypertension: Systematic review and meta-analysis of prospective studies. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, 2022.

Hernández-Montiel, L.G. *et al.* First Report of Sour Rot Caused by *Geotrichum citri-aurantii* on Key Lime (*Citrus aurantifolia*) in Colima State, Mexico. **Plant Disease**, 2010.

Herppich, W.B. *et al.* Optimization of Short-Term Hot-Water Treatment of Apples for Fruit Salad Production by Non-Invasive Chlorophyll-Fluorescence Imaging. **Foods**, 2020.

Hoog, G.S. e Smith, M.T. Ribosomal gene phylogeny and species delimitation in *Geotrichum* and its teleomorphs. **Studies in mycology**, 2004.

Hoog, G.S., Smith, M.T. Chapter 91 - *Geotrichum* Link: Fries (1832). **The Yeasts (Fifth Edition)**, p. 1279-1286, 2011.

Horita, H.; Hatta, Y. Sour rot of carrot caused by *Geotrichum candidum* in Japan. **Journal of General Plant Pathology**, 2016.

Hosseine, F.S. *et al.* Effects of a rotational UV-C irradiation system and packaging on the shelf life of fresh pistachio. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2019.

Hsu, Y. *et al.* Quarantine Vapor Heat Treatment of Papaya Fruit for *Bactrocera dorsalis* and *Bactrocera cucurbitae* (Diptera: Tephritidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 111, p. 2101-2109, out. 2018.

Hu, M. Chen, P.I. Non-Target Site Mechanisms of Fungicide Resistance in Crop Pathogens: A Review. **Microorganisms**, jan. 2021.

Hussain, M. *et al.* First Report of Fruit Rot of Strawberry Caused by *Geotrichum candidum* in Pakistan. **Plant disease**, jun. 2016.

IBAMA. Relatório de comercialização de agrotóxicos (2020). Disponível em:<<http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#sobreosrelatorios>>. Acesso em: 12 de dez. de 2021.

Ikegaya, A. *et al.* Quality Evaluation of Fruits and Vegetables in Mixed Cargo Exported by Sea. **The horticulture Journal**, v. 78, p. 548-558, 2019.

Imaizumi, T. *et al.* Responses of phytonutrients and tissue condition in persimmon and cucumber to postharvest UV-C irradiation. **Postharvest Biology and Technology**, v. 145, p. 33-40, nov., 2018.

Islam, Md. S. *et al.* Pesticides and Parkinson's disease: Current and future perspective. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, 2021.

Jermann, C. Mapping trends in novel and emerging food processing technologies around the world. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, 2015.

Jin, P. *et al.* UV-C enhances resistance against gray mold decay caused by *Botrytis cinerea* in strawberry fruit. **Scientia Horticulturae**, v. 225, p.106-111, 2017.

Junior, D.M. Citros: principais informações e recomendações de cultivo. IAC – Instituto Agrônômico de Campinas, 2005.

Kabelitz, T. *et al.* Effects of hot water dipping on apple heat transfer and post-harvest fruit quality. **LWT**, v. 108, p. 416-420, 2019.

Kabelitz, T., Hassenberg, Control of apple surface microflora for fresh-cut produce by post-harvest hot-water treatment. **LWT**, v. 98, p.492-499, 2018.

Karabulut, O.A. *et al.* Control of brown rot of stone fruits by brief heated water immersion treatments. **Crop Protection**, dez. 2010.

Karim, H. *et al.* Use of *Cistus* aqueous extracts as botanical fungicides in the control of Citrus sour rot. **Microbial Pathogenesis**, v. 104, p.263-267, 2017.

Kean, R. *et al.* Candida auris: A Decade of Understanding of an Enigmatic Pathogenic Yeast. **Journal of Fungi**, fev. 2020.

Keene, S. *et al.* Cutaneous geotrichosis due to Geotrichum candidum in a burn patient. **Access Microbiology**, 2019.

Kelepertzis, E. Accumulation of heavy metals in agricultural soils of Mediterranean: Insights from Argolida basin, Peloponnese, Greece. **Geoderma**, v. 221-222, p. 82-90, 2014.

Kellerman, M. *et al.* Postharvest dip, drench and wax coating application of pyrimethanil on citrus fruit: Residue loading and green mould control. **Crop Protection**, p. 115-129, 2018.

Khan, M.F.R. *et al.* First Report of Geotrichum candidum Causing Postharvest Rot of Sugar Beet (Beta vulgaris) Roots in Minnesota and North Dakota. **Plant disease**, 2019.

Kimball, D.A. Description of Citrus Fruit. **Citrus Processing**, p. 7-42, 1999.

Kitinoja, L. *et al.* Clean cold chain development and the critical role of extension education. **Agriculture for Development**, 2019.

Klein, M.N., Kupper, K.C. Biofilm production by Aureobasidium pullulans improves biocontrol against sour rot in citrus. **Food Microbiology**, v. 69, 2018.

Koch, R. Ueber die Milzbrandimpfung. Berlag von Theodor Fitcher, 1882.

Konda, E.T. *et al.* Controle de podridão peduncular do mamão utilizando irradiação UV-C. **12º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica (CIIC 2018)**, Campinas, São Paulo, agos. 2018.

Kuniga, T. *et al.* Changes in scoparone concentrations in citrus cultivars after ultraviolet radiation. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, v. 75, p. 328–330, 2006.

Ladaniya, M.S. Postharvest diseases and their management. **Citrus Fruit**, p.417-449, 2008.

Lado, J. *et al.* Maturity indicators and citrus fruit quality. **Stewart Postharvest Review**, 2014.

Laste, G. D. *et al.* Características botânicas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003.

- Latado, R.R. *et al.* Acúmulo de antocianinas e características físicas e químicas de frutos de laranjas sanguíneas durante o armazenamento a frio. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 2008.
- Lechner, F. E. *et al.* Yeasts and Molds | *Geotrichum candidum*. **Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition)**, p. 765-771, 2011.
- Leite, F.N. Calibração de dispositivos a cores utilizando uma câmera digital. Dissertação de Mestrado em Engenharia Elétrica, Universidade de Brasília, Faculdade de Tecnologia, Brasília, DF, 2006.
- Leonel, A.C. *et al.* The pesticides use and the risk for head and neck cancer: A review of case-control studies. **Medicina Oral, Patologia Oral y Cirugia Bucal**, 2021.
- Linaker, C., Smedley, J. Respiratory illness in agricultural workers. **Occupational Medicine**, v. 52, p. 451-459, 2002.
- Liu, S. *et al.* Control of sour rot in citrus fruit by three insect antimicrobial peptides. **Postharvest Biology and Technology**, v. 149, p. 200-208, mar. 2019.
- Liu, X. *et al.* Antifungal activity of thyme oil against *Geotrichum citri-aurantii* *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Applied Microbiology**, 2009.
- Lurie, S. Postharvest heat treatments. **Postharvest Biology and Technology**, v. 14, p. 257-269, nov. 1998.
- Luckey, T.D. Hormesis with Ionizing Radiation. **CRC Press**, 1980.
- Peña, M.M., *et al.* O. Novel technologies to improve food safety and quality. **Current Opinion in Food Science**, v. 30, dez. 2019.
- Ma, G. *et al.* Chapter 24 - Citrus and health. *The Genus Citrus*, p. 495-511, 2020.
- Ma, W. *et al.* A new disease of strawberry, fruit rot, caused by *Geotrichum candidum* in China. **Plant Protect**, 2017.
- Magalhães, A.F.J. *et al.* Sistema de produção para pequenos produtores de Citrus do Nordeste. *Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical*, 2005.

Mahajan, B.V.C., Kapoor,S. Postharvest handling of fruits and vegetables for disease management. Postharvest Handling and Diseases of Horticultural Produce. **CRC Press Taylor and Francis Groups**, p. 33-42, 2021.

Marquenie, D. *et al.* Using survival analysis to investigate the effect of UV-C and heat treatment on storage rot of strawberry and sweet cherry. **International Journal of Food Microbiology**, p. 187-196, 2002.

Mansouri, E.H., Reggabi, M. Association between type 2 diabetes and exposure to chlorinated persistent organic pollutants in Algeria: A case-control study. **Chemosphere**, 2021.

Mao, J. *et al.* A Structure Identification and Toxicity Assessment of the Degradation Products of Aflatoxin B1 in Peanut Oil under UV Irradiation. **Toxins**, 2016.

Martin, F.L. *et al.* Increased exposure to pesticides and colon cancer: Early evidence in Brazil. **Chemosphere**, v. 209, p.623-631, out. 2018.

Martínez-Blay. V. *et al.* Control of major citrus postharvest diseases by sulfur-containing food additives. **International Journal of Food Microbiology**, v. 330, out. 2020.

Masoodi, K.Z. *et al.* Advanced Methods in Molecular Biology and Biotechnology. A Practical Lab Manual, 2021.

McDonald, B. Linde, C. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 40, 2002.

McKay, A.H. *et al.* Efficacy and Application Strategies for Propiconazole as a New Postharvest Fungicide for Managing Sour Rot and Green Mold of Citrus Fruit. **Plant Disease**, jan. 2012.

Menezes, M., Assis, S.M.P. Guia prático para fungos fitopatogênicos. Imprensa universitária, UFRPE, 2ª ed, Recife, Brasil, 2004.

Michailides, T.J *et al.* First Report of Sour Rot of California Peaches and Nectarines Caused by Yeasts. **Plant Disease**, mar., 2007.

Michailidis, M. *et al.* Metabolic features underlying the response of sweet cherry fruit to postharvest UV-C irradiation. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 144, p. 49-57, nov. 2019.

Mickalsky, M. Hooda, P.S. Greenhouse gas emissions of imported and locally produced fruit and vegetable commodities: A quantitative assessment. **Environmental Science & Policy**, v. 48, p. 32-43, 2015.

Minolta. Konica Minolta. Comunicação precisa da cor. O padrão em medição de cor, **Sensing Americas**, 2021.

Mirdehghan, S.H. e Rahemi, M. Effects of hot water treatment on reducing chilling injury of pomegranate (*Punica granatum*) fruit during storage. **Acta Horticulturae**, 2005.

Mirdehghan, S.H., Rahemi, M. Effects of hot water treatment on reducing chilling injury of pomegranate (*Punica granatum*) fruit during storage. *Acta Horticulturae*, p. 887-892, 2005

Mohammed, S.G.; Qoronfleh, M.W. Fruits. **Personalized Food Intervention and Therapy for Autism Spectrum Disorder Management**, v.24, p. 279-376, fev.,2020.

Mortazavi, N. *et al.* Organochlorine and organophosphorus pesticides and bladder cancer: A case-control study. **Journal of Cellular Biochemistry**, 2019.

Musumeci, R. *et al.* *Citrus* fruits and their flavonoids in inflammatory bowel disease: an overview. **Natural Product Research**, 2019.

Nafussi, B. *et al.* Mode of action of hot-water dip in reducing decay of lemon fruit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2001.

Nagy, S. Vitamin C contents of citrus fruit and their products: a review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 1980.

Nakamura, M. *et al.* Comparison of endo-polygalacturonase activities of citrus and non-citrus races of *Geotrichum candidum*, and cloning and expression of the corresponding genes. **Molecular Plant Pathology**, 2001.

Nakamura, M. *et al.* Differentiation of pathogenic and nonpathogenic isolates of *Geotrichum candidum* sensu Suprapta et al. (1995) on citrus fruit based on PCR-RFLP analysis of rDNA ITS and PCR using specific primers designed in polygalacturonase genes. **Mycoscience**, 2007.

Nanodrop. NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer, V1.0 User Manual. **Thermo Fisher Scientific Inc.** Disponível em: < <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/manuals/NanoDrop-2000-User-Manual-EN.pdf>>. Acesso em: 31 de jan. de 2022.

Nardello, I.C. *et al.* Quality of strawberries subjected to pre-harvest UV-C radiation. **Horticultural Science**, 2021.

Nasef, I.N. Short hot water as safe treatment induces chilling tolerance and antioxidant enzymes, prevents decay and maintains quality of cold-stored cucumbers. **Postharvest Biology and Technology**, v. 138, p.1-10, 2018.

Neto, B.B., *et al.* Como fazer experimentos. Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. Bookman, 4^a ed., 2010.

Nnadi, N.E., Carter, D.A. Climate change and the emergence of fungal pathogens. **Plos Pathogens**, 2021.

Nuratika, S.M.T *et al.* Controlling Musa AAA Berangan crown rot disease using UV-C irradiation. **Acta Horticulturae**, 2018.

Ollitrault, P. *et al.* *Citrus* taxonomy. **The Genus Citrus**, p. 57-81, 2020.

Oviedo, G.A.L. *et al.* Estudio de fotoreactivación em cultivos microbiológicos obtenidos de carga microbiana de la superficie de fresas sometidas a diferentes dosis de luz ultra violeta de onda corta UV-C. **Revista Colombiana de Investigaciones Agroindustriales**, 2018.

Paes, S.A. Diversidade genética de isolados de *Geotrichum* spp. associados a podridões pós-colheita em frutas e hortaliças no Brasil. Dissertação Mestrado em Microbiologia agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2016.

Pankaj, S.K. *et al.* A review of novel physical and chemical decontamination technologies for aflatoxin in food. **Trends in Food Science & Technology**, v.71, p.73-83, jan. 2018.

Papoutsis, K. *et al.* Non-chemical treatments for preventing the postharvest fungal rotting of citrus caused by *Penicillium digitatum* (green mold) and *Penicillium italicum* (blue mold). **Trends in Food Science & Technology**, v. 86, p. 479-491, 2019.

Passos, O.S. *et al.* Citrus Industry in Brazil with Emphasis on Tropical Areas. **Citrus - health benefits and production technology**. Londres, 2019.

Pathak, B. *et al.* eEffect of ther mal and non-ther mal pro cess ing meth ods on food allergens. **Society for Scientific Development**, v. 13, 2018.

Peles, F. *et al.* Adverse Effects, Transformation and Channeling of Aflatoxins Into Food Raw Materials in Livestock. **Frontiers in Microbiology**, 2019.

Pennock, W., Maldonado, G. Hot-Water Treatment of Mango Fruits to Reduce Anthracnose Decay. **The journal of agriculture**, 1962.

Perrin, L. *et al.* Pesticides expenditures by farming type and incidence of Parkinson disease in farmers: A French nationwide study. **Environmental Research**, 2021.

Phonyiam, O. *et al.* Postharvest UV-C Irradiation Influenced Cellular Structure, Jasmonic Acid Accumulation, and Resistance Against Green Mold Decay in Satsuma Mandarin Fruit (*Citrus unshiu*). **Frontiers in Sustainable Food Systems**, jun. 2021.

Piel, C. Agricultural exposures to carbamate herbicides and fungicides and central nervous system tumour incidence in the cohort AGRICAN. **Environment International**, v. 130, set., 2019.

Plaza, P. *et al.* Effect of water activity and temperature on competing abilities of common postharvest citrus fungi. **International Journal of Food Microbiology**, v. 90, p. 75-92, 2004.

Porat, *et al.* Reduction of postharvest decay in organic citrus fruit by a short hot water brushing treatment. **Postharvest Biology and Technology**, v.18, p.151-157, 2000.

Pratella, G. *et al.* Postharvest disease problems of Italian citrus fruit. **Proceedings of the 1st International Citrus Symposium**, v. 3, 1969.

Pretorius, C.J., Steyn, W.J.V.D.M. Quality deterioration and loss of shelf life as a result of poor road conditions. **International Journal of Postharvest Technology and Innovation**, v. 6, p. 26-45, 2019.

Pristijono, P., Golding, J.B. e Bowyer, M.C. Postharvest UV-C Treatment, Followed by Storage in a Continuous Low-Level Ethylene Atmosphere, Maintains the Quality of 'Kensington Pride' Mango Fruit Stored at 20°C. **Horticulturae**, dez. 2018.

Ramjan, Md, Ansari, M.T. Factors affecting of fruits, vegetables and its quality. **Journal of Medicinal Plants Studies**, 2018.

- Rapisarda, P. *et al.* Effect of cold storage on vitamin C, phenolics and antioxidant activity of five orange genotypes [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. **Postharvest Biology and Technology**, v. 49, p. 348-354, 2008.
- Rastogi, R.P. *et al.* Molecular Mechanisms of Ultraviolet Radiation-Induced DNA Damage and Repair. **Journal of Nucleic Acids**, 2010.
- Rattay, F., Eppert, I. Secondary Cultures. **Encyclopedia of Dairy Sciences**. Academic Press, 3^aed, p.336-342, 2021.
- Reddy, S.V., *et al.* Chapter 6 - Use of Irradiation for Postharvest Disinfection of Fruits and Vegetables. **Postharvest Disinfection of Fruits and Vegetables**, p. 121-136, 2018.
- Ren, L. *et al.* Vapor heat treatment against *Planococcus lilacinus* Cockerell (Hemiptera: Pseudococcidae) on dragon fruit. **Pest management Science**, v.78, p. 150-158, agos. 2021.
- Rizwan, H.M. *et al.* Identification of Fungal Pathogens to Control Postharvest Passion Fruit (*Passiflora edulis*) Decays and Multi-Omics Comparative Pathway Analysis Reveals Purple Is More Resistant to Pathogens than a Yellow Cultivar. **Journal of Fungi**, 2021.
- Romanazzi, G., Feliziani, E. Chapter 6 - Use of Chitosan to Control Postharvest Decay of Temperate Fruit: Effectiveness and Mechanisms of Action. **Chitosan in the Preservation of Agricultural Commodities**, p. 155-177, 2016.
- Ross, K., *et al.* Enhancing ndcs: Opportunities in Agriculture.” Working Paper, World Resources Institute. Disponível em: < <https://oxfamilibrary.openrepository.com>. Acesso em: 28 de jan. 2022.
- Rodov, V. *et al.* Ultraviolet illumination induces scoparone production in kumquat and orange fruit and improves decay resistance. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, p. 788-792, 1992.
- Russel, R.C. A Study of the Hot Water Treatment of Barley for the Control of Loose Smut, *Ustilago Nuda*. **Scientific Agriculture**. V. 30, jul. 1950.
- Sánchez-Torres, P. Molecular Mechanisms Underlying Fungicide Resistance in Citrus Postharvest Green Mold. **Journal of Fungi**, set. 2021.

Santos, R.M. Caracterização morfoagronômica e físico-química de germoplasma de citrus. **Centro científico conhecer**, 2016.

Santhirasegaram, V. *et al.* Comparison of UV-C treatment and thermal pasteurization on quality of Chokanan mango (*Mangifera indica* L.) juice. **Food and Bioproducts Processing**, v. 94, p. 313-321, 2015.

Sari, L.K., Seta, S., Naradisorn, M. Effect of UV-C irradiation on postharvest quality of 'Phulae' pineapple. **Scientia Horticulturae**, v. 213, p. 314-320, dez. 2016.

Schoch, C.L. *et al.* Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. **Microbiology**, 2012.

Scuri, A. E. Fundamentos da imagem digital. Tecgraf, PUC/Rio de Janeiro (2002). Disponível em:< <https://web.tecgraf.puc-rio.br/~scuri/download/fid.pdf>>. Acesso em: 20 de mai. 2022.

Searchinger, T. *et al.* World Resources Report: Creating a Sustainable Food Future (2018). Disponível em:<https://www.researchgate.net/publication/329453910_World_Resources_Report_Creating_a_Sustainable_Food_Future>. Acesso em: 28 de jan. 2022.

Serna-Escolano *et al.* Effect of Thymol and Carvacrol Encapsulated in Hp-B-Cyclodextrin by Two Inclusion Methods against *Geotrichum citri-aurantii*. **Food Microbiology & Safety**, 2019.

Shama, G. Ultraviolet Light. **Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)**, p. 665-671, 2014.

Sibomana, M. *et al.* An integrated analysis of tomato supply networks in Nigeria to improve efficiency and quality. **Acta horticulturae**, 2019.

Silva, Y. C.R. *et al.* Chitosan and hot water treatments reduce postharvest green mould in 'Murcott' tangor. **Journal of phytopathology**, v. 168, p. 542-550, 2020.

Silva, M. C.C.R. Efeito da quitosana e da radiação UV-C no controle de *Guinardia citricarpa* em laranja pós-colheita. Dissertação de mestrado em Agronomia, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

Singh, D. *et al.* Postharvest Losses of Horticultural Produce. Postharvest Handling and Diseases of Horticultural Produce. **CRC Press Taylor and Francis Groups**, 2021.

Sivakumar, D., Fallik, E. Influence of Heat Treatments on Quality Retention of Fresh and Fresh-Cut Produce. **Food Reviews International**, v. 29, 2013.

Smilanick, J.L. *et al.* Chapter 1 – Citrus Fruits. Postharvest Pathology of Fresh Horticultural Produce, CRC Press, **Taylor & Francis Group**, p. 23-39, 2020.

Smilanick, J.L. *et al.* Control of citrus postharvest green mold and sour rot by potassium sorbate combined with heat and fungicides. **Postharvest Biology and Technology**, v. 47, p.226-238, 2008.

Smilanick, J.L. *et al.* Impact of a Brief Postharvest Hot Water Drench Treatment on decay, fruit appearance, and microbe populations of California lemons and oranges. *Hort technology*, 2003.

Smilanick, J.L. *et al.* The effectiveness of pyrimethanil to inhibit germination of *Penicillium* Smith, C.O. Sour rot of lemon in California. **Phytopathology**, 1917.

Soto-Muñoz, L. *et al.* Curative activity of postharvest GRAS salt treatments to control citrus sour rot caused by *Geotrichum citri-aurantii*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 335, dez. 2020.

Soto-Muñoz, L. *et al.* Starch-based antifungal edible coatings to control sour rot caused by *Geotrichum citri-aurantii* and maintain postharvest quality of 'Fino' lemon. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, jul. 2021.

Soto-Muñoz, L., Taberner, V. e Palou, L. Tratamientos poscosecha con aditivos alimentarios para controlar la podredumbre amarga de los cítricos. *Horticultura*, 2021.

Stevens, C. *et al.* Application of Hormetic UV-C for Delayed Ripening and Reduction of Rhizopus Soft Rot in Tomatoes: the Effect of Tomatine on Storage Rot Development.. **Journal Phytopathology**, p. 211-221, 1998.

Stevens, C. *et al.* The germicidal and hormetic effects of UV-C light on reducing brown rot disease and yeast microflora of peaches. **Crop Protection**, v. 17, fev. 1998.

Stoleski, S. *et al.* Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease Associated With Occupational Exposure in Dairy Farmers - Importance of Job Exposure Matrices. **Macedonian Journal of Medical Sciences**, 2019.

Stoops, J. *et al.* Decontamination of powdery and granular foods using Continuous Wave UV radiation in a dynamic process. **Journal of Food Engineering**, v. 119, p. 254-259, 2013.

Strano, M.C. *et al.* Advance in Citrus Postharvest Management: Diseases, Cold Storage and Quality Evaluation. **Citrus Pathology**, 2016.

Strano, M.C. *et al.* Hot water dipping treatments on Tarocco orange fruit and their effects on peel essential oil. **Postharvest Biology and Technology**, 2014.

Suprapta, D.N. *et al.* Distribution of *Geotrichum candidum* citrus race in citrus groves and non-citrus fields in Japan. **Mycoscience**, 1995.

Take, B.H., Unluturk, B. Effect of postharvest UV-C treatment on the microbial quality of 'Şalak' apricot. **Scientia Horticulturae**, v. 233, p. 370-377, 2018.

Tang, D. *et al.* Effects of Combined Heat and Preservative Treatment on Storability of Ponkan Fruit (*Citrus reticulata* Blanco cv. Ponkan) during Postharvest Storage. **Journal of Food Quality**, 2017.

Tang, X. *et al.* Antifungal mechanism of sodium dehydroacetate against *Geotrichum citri-aurantii*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, jan. 2018.

Teófilo, R.F., Ferreira, M.C.C. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, v. 29, 2006.

Terao, D. *et al.* Alternative Strategy on Control of Postharvest Diseases of Mango (*Mangifera indica* L.) by Use of Low Dose of Ultraviolet-C Irradiation. **Food Engineering Reviews**, 2014.

Terao, D. *et al.* Physical postharvest treatments in the control of stem-end rot of mango. **Journal of phytopathology**, 2018.

Terao, D. *et al.* Control of *Fusarium* rot in Galia melon and preservation of fruit quality with UV-C radiation and hot water treatments. **Tropical Plant Pathology**, 2021.

Terao, D. *et al.* Physical postharvest treatments combined with antagonistic yeast on the control of orange green mold. **Scientia Horticulturae**, v. 224, p.317-323, out. 2017.

Terra, L.R. *et al.* Otimização do processo não invasivo e não destrutivo de extração e análise de metabólitos voláteis de mamão papaia por SPME-GC-MS. **Química Nova**, 2020.

Thomidis, T. *et al.* Effect of temperature on the growth of *Geotrichum candidum* and chemical control of sour rot on tomatoes. **Tropical Plant Pathology**, v. 46, p. 545-552, agos. 2021.

Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, 1994.

Tonutti, P., Bonghi, C., e Brizzolara, S. Chapter 8 - Multiomics approaches for the improvements of postharvest systems. *Postharvest Handling: A Systems Approach*. **Academic Press**, 4ª ed, p. 251-254, 2022.

Triantafyllidis, V. Environmental Implications from Long-term Citrus Cultivation and Wide Use of Cu Fungicides in Mediterranean **Soils**. **Water, Air, & Soil Pollution**, 2020.

Trove. The Jensen method – hot water treatment. **Launceston examiner** (1893). Disponível em: <<https://trove.nla.gov.au/newspaper/article/90218306>>. Acesso em: 05 de out. de 2021.

Tutem, E. *et al.* Chapter 22 – Orange. **Nutritional Composition and Antioxidant Properties of Fruits and Vegetables**, p. 353-376, 2020.

UFRGS. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Espectro eletromagnético. Disponível em:< <http://www.if.ufrgs.br/tex/fis01043/20022/Carla/espectro.htm>>. Acesso em 14 de mai. 2022.

UNEP. United Nations Environment Programme (2020). Emissions Gap Report 2020. Disponível em:< <https://www.unep.org/emissions-gap-report-2020>>. Acesso em: 28 de jan. 2022.

Urban, L. *et al.* Understanding the physiological effects of UV-C light and exploiting its agronomic potential before and after Harvest. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 105, 2016.

Usall, J. *et al.* Physical treatments to control postharvest diseases of fresh fruits and vegetables. **Postharvest Biology and Technology**, v. 122, p.30-40, 2016.

Usberti, F.C.S., Ferraz, A.C.O. UV-C radiation on fresh fig quality. **Scientia Agricola**, out. 2019.

USDA, United States Department of Agriculture (2021). Citrus: World Markets and Trade. Disponível em: <<https://downloads.usda.library.cornell.edu/usda-esmis/files/w66343603/b8516k98g/2514ph35q/citrus.pdf>>. Acesso em: 12 de dez 2021.

Wang, W. Control of Citrus Post-harvest Green Molds, Blue Molds, and Sour Rot by the Cecropin A-Melittin Hybrid Peptide BP21. *Frontiers in Microbiology*, out. 2018.

Webber, H.J. History and development of the Citrus industry. **The Citrus Industry**, p. 1-39, 1967.

Wells, J.M. Sour Rot of Peaches Caused by *Monilia implicata* and *Geotrichum candidum*. **Postharvest Pathology and Mycotoxins**, 1976.

Wilson, B.D. *et al.* Comprehensive Review of Ultraviolet Radiation and the Current Status on Sunscreens. **The Journal of Clinical and Aesthetic**, set. 2012.

Xylia, P. *et al.* Mint and pomegranate extracts/oils as antibacterial agents against *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* on shredded carrots. **Journal of Food Safety**, 2017.

Youssef, K., Hussien, A. Electrolysed water and salt solutions can reduce green and blue molds while maintain the quality properties of 'Valencia' late oranges. **Postharvest Biology and Technology**, v.159, jan. 2020.

Ysman, B., Biyik, H. The aflatoxin contamination of fig fruits in aydin city (Turkey). **Journal of Food Safety**, 2009.

Zacarias, L. *et al.* Chapter 21 - Postharvest technology of citrus fruits. **The Genus Citrus**, p. 421-446, 2020.

Zeide, A. Grocery garbage: food waste and the rise of supermarkets in the mid-twentieth century United States. **History of Retailing and Consumption**, v.5, 2019

Zhao, J. *et al.* Genome sequencing and transcriptome analysis of *Geotrichum citri-aurantii* on citrus reveal the potential pathogenic- and guazatine-resistance related genes. **Genomics**, v. 112, nov. 2020.

Zhu, B. *et al.* Triazole-induced toxicity in developing rare minnow (*Gobiocypris rarus*) embryos. **Environmental Science and Pollution Research**, 2014.

Zubrod, J.P. *et al.* Fungicides: An Overlooked Pesticide Class? **Environmental Science & Technology**, 2019.

10. APÊNDICE

Tabela 9.1 Sequências consenso geradas através do software BioEdit 7.2 dos *primers* ITS4/ITS5, NS1/NS4 e LROR/LR5, com sua respectiva quantidade de nucleotídeos.

<i>Primers</i>	Sequência consenso	Tamanho do fragmento (nucleotídeos)
ITS4/ITS5	GTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATTGATACACTAAATTT GTGAATAAATTCAACAAACTTTAATTATATAATCAAAAAATAA AAAATCAAACTTTTAACAATGGATCTCTTGGTTCTCGTATCG ATGAAGAACGCAGCGAAACGCGATATTTCTTGTGAATTGCAG AAGTGAATCATCAGTTTTTGAACGCACATTGCACTTTGGGGTA TCCCCCAAAGTATACCTGTTTGAGCGTTGTTTCTCTCTTGGAAAT TGCATTGCTTTTCTAAAATAACGAAACAAAATTGTTTGTATTA AATTATAATCAACCTCAGATCAAGTAGGACTACCCGCTG	340 pb
NS1/NS4	TTCATTCACAGTACGTAGTCATCAAGTTAAGCCGTAGTAATGC TAGAGATAATGACATGTCTAAAGACGGCCCGGATCTACCGGCT CGTATTTATGAGATAAAAAACCAATGCATGCGGGCGCTAGTG AGTGAATCATAATGAACTTGTGCAATAGCATGGCCTTGTGCAG GCGATGGTTCATTCAAATTTCTGTCCCTATCAACTTTCTGATGG TAGGATAGAGGCCTACCATGGTTTTAACGGGTAACGGGGAAT CAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCA CATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGA CACAGGGAGGTAGTGACAATAAATAACGATACGGGGCCTATT AGGTCTCGTAATTGGAATCAGAACAATTTAAATACCTTAACGA GGAACAATTAGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAA TTCCAGCTCTGATAGTATATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAA GCTCGTAGTTGAAACTTGGATGTTGAGGGGTGGTCTTTTTTTTA AGTACTACTAGGAAACATCTTTCTTTGGTGGAAAGCTCTCTATTT ATTTACGGAGAATAAACCAAACATTTACTTTGAAAAAATTAGA GTGTTCAAAGCAGGCCTCTGCTCGAATATATTAACATGGAATC AATAGAATACGACGCATGGTTATATTTTGTGGTTTCTTAGGA CCGTACCATAATGATTAATAGGGACGGACGGGGACATCAGTA TCCACTTGTCAGAGGCGAAATACTTCGGATTTACTGTAATGAC TAACCTACTGCAGAAAGCATTGTTGCAAGGTACGTTTTTCTATT AATTCAAGAACGAAAGATACGGGCATCTGAAGAACGATTCAT GTATACTCGTATCGATAGTCTCATCAACTCGTAAAATAC	937 pb
LROR/LR5	ACCTAGAATGATACGAATGAGTCGTTCTGCCCCTATACCACAA ATACGTACGATCGATTTAGCACGTCAGCAACAGCTACGAGCCT CCACCAGAGTTTCCCTCTGGCTTACCATATTCAGGCAGTAGTT CACCATCTTTCGGGTCCCAACAGCTATGATGCTTACTCAAATC CATCATGAAATCTTCAGGATCGGTCGATAGTGCGCATAAAATG CTCCTATCTTCCCTTCACTTTCATTACGCGGAGGGGTTTTACACC CAAACACTCGAATAGACATTAGACTCCTTGGTCCGTGTTTCAA GACGGGCGGAAAAGAATCATTATGCAAAAAGTCCTTGCCGAAC CGCACTCCTGAGGCGACTGAGGAGTTATGAAAGTAGGTTACA	880 pb

ACACTCCGAGGAGCTACATTCCTACTTCTTTTTCACTCCCAATC
ACCCACCTTGGCCTAGTATTGTTGAATACACACTGCCAAAAC
AATGCTCAACAACAAAACCACGTCATGATTCAATACCCTTCCC
TTTTAACAAATTCACGTAATTTGCACTCTCTCTTTCAAAGATT
GCTTTATCATCCTTCCTTCACAGTACTTGTTCGCTATCGGTCTC
TCGTCAATATGTTAGCGTGAGAAGGAATTTACCTCCCACTTAG
AGCTGCATTCCCAAACGACACTCGACTCTACGAAAGCATCTTA
CAATGAAGAATAGATATTGACGGGGATGTCACCATCTAAGGC
TGCTGTACTCCAACAGACTATATACTCCGCTCTCAATGAGACG
AATCTACAAAGTACAACCTCGACCTGGTCGACTGACTGCAAATT
AGAGCTGTTGCAGCTTCACTCGCCGTTACTAAGCGCAATCCAT
GTAGCTTCCCTTCCCCCAT

11. ANEXO

11.1. Anexo I - Planejamento experimental multivariado

O planejamento experimental é baseado em princípios estatísticos e matemáticos, onde poderá extrair através de um modelo, o máximo de informações úteis, realizando um menor número de experimentos (Neto *et al.*, 2010).

Há algumas nomenclaturas que precisam ser apresentadas para o melhor entendimento do assunto. Por exemplo, em uma indústria o técnico responsável precisa obter um melhor rendimento em uma reação (resposta). Supomos que ele saiba que a temperatura e a concentração de um reagente (fatores) afetam esse rendimento. O objetivo do técnico será descobrir quais os níveis dos fatores produzem uma melhor resposta. A propriedade de interesse é chamada de resposta; as variáveis que influenciam a resposta são chamadas de fatores (ou variáveis) e os valores dos fatores são chamados de níveis (Neto *et al.*, 2010). As técnicas de planejamento experimental auxiliam em encontrar esses objetivos. O exemplo é referente à área química, mas o planejamento experimental pode ser aplicado em diversas áreas, pois o princípio estatístico é o mesmo.

Para início do planejamento, primeiramente deve-se definir os fatores (variáveis de entrada), a resposta (variáveis de saída) e o objetivo que se pretende atingir realizando os experimentos. Às vezes, em um sistema, o interesse é somente avaliar a influência de uma variável sobre a outra, neste caso pode-se utilizar o planejamento fatorial. Porém, se o objetivo é otimizar a resposta, ou seja, encontrar na superfície uma região que seja ótima, definida pelos níveis dos fatores, utiliza-se a metodologia da superfície de resposta (RSM) (Box e Wilson, 1951). Além disso o efeito individual e interações podem ser estudados usando um único planejamento. Para modelar a RSM é utilizado o planejamento composto central (CCD - *Central Composite Design*), que permite ajustar um modelo completo. O CCD pode ser representado através de um sistema de coordenadas formado por três pontos, conforme representado na Figura 30:

Fatorial: são os pontos representados pelo nível superior (+) e inferior (-). Os níveis dos fatores podem ser substituídos por -1 e +1, que corresponde a uma codificação das variáveis originais. Para transformar o nível inferior (N_i) e o nível superior (N_s) em -1 (equação 12) e +1 (equação 13), basta subtrair cada um pelo valor médio (V_m) e dividir pela metade da subtração dos dois níveis, ou seja:

$$\frac{Ni - Vm}{\frac{Ns - Ni}{2}} = -1 \quad (12)$$

$$\frac{Ns - Vm}{\frac{Ns - Ni}{2}} = +1 \quad (13)$$

Axial: são os pontos extremos no sistema cartesiano. A distância entre o ponto axial e central é chamado de alfa (α). Para obter um modelo CCD rotacional o valor de α deve ser: $\alpha = \sqrt[4]{2^k}$. Então, para dois fatores ($k=2$), $\alpha = 1,41421$ e para três fatores ($k = 3$), $\alpha = 1,6818$.

Central: é representado pelo número 0 (zero) e corresponde às repetições no ponto central. É obtido através da média dos níveis + e nível -.

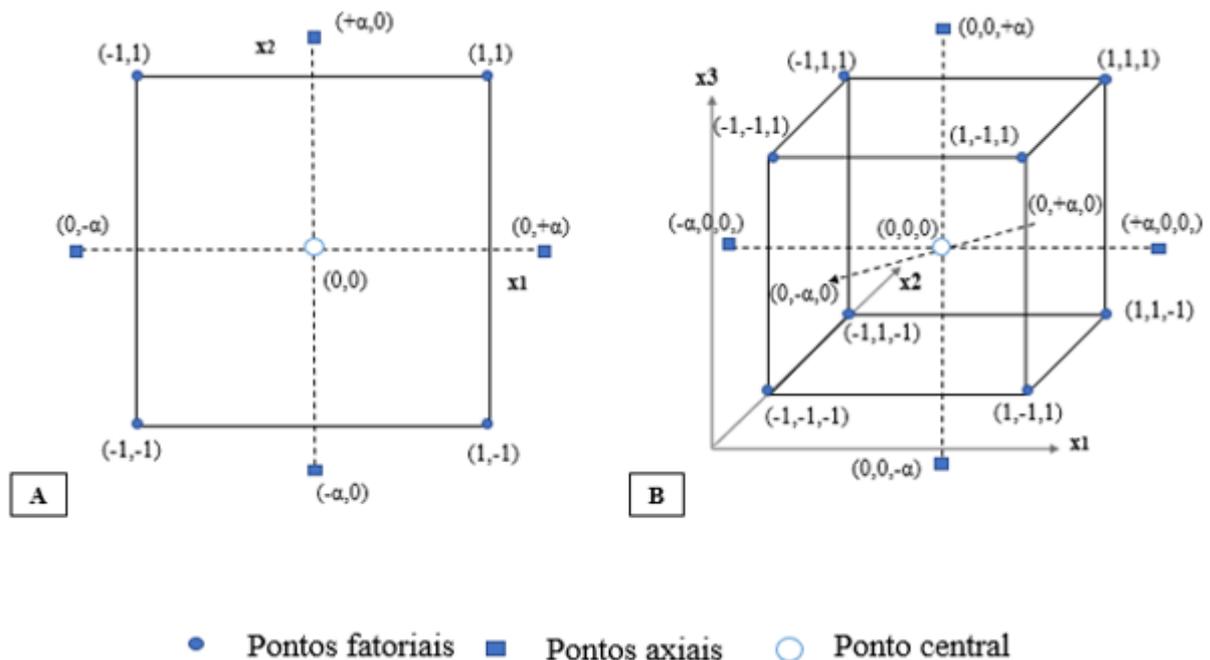


Figura 30. Representação de um sistema cartesiano com os pontos experimentais para dois (A) e três fatores (B) (Adaptado de Teófilo e Ferreira, 2006).

Para realizar um planejamento CCD define-se o número de variáveis (k) e o número de experimentos (ensaios). Calcula-se a quantidade de experimentos (N) a serem realizados, através da equação 14 (Neto *et al.*, 2010):

$$N = 2^k + 2.k + n_0 \quad (14)$$

Onde a quantidade de experimentos é dada pela soma do número de pontos fatoriais (2^k), axiais ($2.k$) e centrais (n_0). Suponhamos que definiu um planejamento com duas variáveis ($k=2$), então serão realizados quatro experimentos no ponto fatorial ($2^k = 2^2 = 4$), quatro no ponto axial ($2.k = 2.2 = 4$) e uma regra prática é fazer de cinco a sete experimentos repetições no ponto central. No planejamento é realizado experimentos em todas as possíveis combinações de níveis dos fatores, para estudo do efeito de um fator sobre uma determinada resposta. Cada um desses experimentos é chamado de ensaio experimental, sendo que cada ensaio representa um ponto em cada vértice do sistema cartesiano (Figura 30). Essas combinações com as respectivas respostas (y) estão listadas na Tabela 19.

Tabela 19. Exemplo de uma matriz de planejamento para dois e três fatores

	Ensaio	x1	x2	Resposta		Ensaio	x1	x2	x3	Resposta
Pontos fatoriais	1	-1	-1	y_1	Pontos fatoriais	1	-1	-1	-1	y_1
	2	1	-1	y_2		2	1	-1	-1	y_2
	3	-1	1	y_3		3	-1	1	-1	y_3
	4	1	1	y_4		4	1	1	-1	y_4
Pontos axiais	5	$-\alpha$	0	y_5	5	-1	-1	1	y_5	
	6	$+\alpha$	0	y_6	6	1	-1	1	y_6	
	7	0	$-\alpha$	y_7	7	-1	1	1	y_7	
	8	0	$+\alpha$	y_8	8	1	1	1	y_8	
Pontos centrais	9	0	0	y_9	9	$-\alpha$	0	0	y_9	
	10	0	0	y_{10}	10	$+\alpha$	0	0	y_{10}	
	11	0	0	y_{11}	11	0	$-\alpha$	0	y_{11}	
	12	0	0	y_{12}	12	0	$+\alpha$	0	y_{12}	
	13	0	0	y_{13}	13	0	0	$-\alpha$	y_{13}	
					14	0	0	$+\alpha$	y_{14}	
					15	0	0	0	y_{15}	
					16	0	0	0	y_{16}	
					17	0	0	0	y_{17}	
					18	0	0	0	y_{18}	
					19	0	0	0	y_{19}	

Em um experimento existem alguns fatores externos que não podem ser controlados, e podem interferir no resultado, como a luminosidade. Por exemplo, parte do experimento realizou-se durante o dia e parte à noite, então o efeito de uma variável pode ser confundido devido a mudança de luminosidade. Para evitar que isso ocorra é recomendado que seja feito a aleatorização (sorteio da ordem dos ensaios), pois a probabilidade que esse fator interfira na resposta será o mesmo para todos.

Na tabela 19 os níveis estão codificados, no entanto para realização do experimento necessita-se decodificá-los para os valores experimentais (Neto *et al.*, 2010).

Começemos com um exemplo, considerando um planejamento para dois fatores: Para avaliar o efeito do aumento da temperatura e da pressão no rendimento de uma reação, o primeiro passo é a escolha dos níveis -1 e $+1$: 40°C e 60°C para a temperatura e 5 e 10 atm para a pressão. Os valores representados são fictícios, com valores reais é importante apoiar-se em referências bibliográficas. O nível 0 (zero) é a média do nível $+1$ e do nível -1 de cada fator. E o valor experimental do α é calculado através da equação 15 (Teófilo e Ferreira, 2006):

$$xi = \frac{z - \bar{z}}{\frac{\Delta z}{2}} \quad (15)$$

Onde: xi é o valor codificado do α ($\alpha = 1,41421$ para dois fatores ou $\alpha = 1,6818$ para três fatores); z o valor experimental do nível α (ao qual pretende-se descobrir); \bar{z} é a média entre o nível -1 e $+1$; Δz é a diferença entre o nível -1 e $+1$ (Teófilo e Ferreira, 2006).

Tabela 20. Exemplo de níveis dos fatores utilizados no planejamento composto central (CCD) para avaliar o efeito da temperatura e da pressão no rendimento de uma reação.

Fatores	Níveis				
	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	35,9	40	50	60	64,1
Pressão (atm)	4,0	5	7,5	10	11,0

$\alpha = 1,41421$

Teófilo e Ferreira (2006) elaboraram uma planilha eletrônica utilizando o Microsoft Excel® com a finalidade de facilitar o cálculo dos valores experimentais dos níveis do CCD. A planilha está disponível em: <http://lqta.iqm.unicamp.br>.

Construindo o modelo de superfície de resposta

Para modelar a superfície de resposta emprega-se funções polinomiais (adição ou subtração de monômios não semelhantes) lineares e quadráticas. Para obtermos um modelo utilizando termos lineares, considerando duas variáveis (x_1 e x_2), utilizamos a equação 16 (Neto *et al.*, 2010):

$$\hat{y} = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{12} x_1 x_2 + \varepsilon \quad (16)$$

Para três variáveis (x_1 , x_2 e x_3), utiliza-se a equação 17:

$$\hat{y} = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{23} x_2 x_3 + \beta_{123} x_1 x_2 x_3 + \varepsilon \quad (17)$$

Onde: β_0 é o valor populacional da média de todas as respostas do planejamento; $\beta_1 x_1$, $\beta_2 x_2$ e $\beta_3 x_3$ é o valor populacional do efeito do fator x_1 , x_2 e x_3 respectivamente; $\beta_{12} x_1 x_2$, $\beta_{13} x_1 x_3$, $\beta_{23} x_2 x_3$, $\beta_{123} x_1 x_2 x_3$ é o valor populacional do efeito da interação; ε é o erro aleatório associado ao modelo. E o β é um estimador dos parâmetros do modelo (Buenos *et al.*, 2010).

Cálculo dos efeitos: O efeito do fator x_1 é a diferença entre a resposta média (\bar{y}_0 no nível + e nível - (equação 18)). Essa expressão também vale para o efeito do fator x_2 e x_3 .

$$X_1 = \bar{y}_+ - \bar{y}_- \quad (18)$$

Quando o efeito de uma variável depende da outra, dizemos que há uma interação entre as variáveis e podemos calcular o valor do efeito dessa interação. Mas antes é necessário construir uma matriz de contraste (representado na Tabela 21), atribuindo sinais algébricos aos ensaios (seguindo a regra de sinais). Aplica-se esses novos sinais a resposta e calcula-se o efeito da interação entre dois e/ou três fatores através da diferença entre a resposta média no nível + e nível -.

Tabela 21. Matriz de coeficientes de contraste para um planejamento para dois fatores ($k=2$) e para três fatores ($k=3$).

Planejamento para dois fatores			Planejamento para três fatores						
Fatores		Interações	Fatores			Interações			
X_1	X_2	X_{12}	X_1	X_2	X_3	X_{12}	X_{13}	X_{23}	X_{123}
-	-	+	-	-	-	+	+	+	-
+	-	-	+	-	-	-	-	+	+
-	+	-	-	+	-	-	+	-	+
+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
			-	-	+	+	-	-	+
			+	-	+	-	+	-	-
			-	+	+	-	-	+	-
			+	+	+	+	+	+	+

Realizando uma interpretação geométrica dos efeitos, temos que o efeito individual é o contraste entre arestas opostas e o efeito de interação é o contraste entre duas diagonais. Através das Figuras 31 e 32 podemos observar essa explanação de uma maneira mais didática.

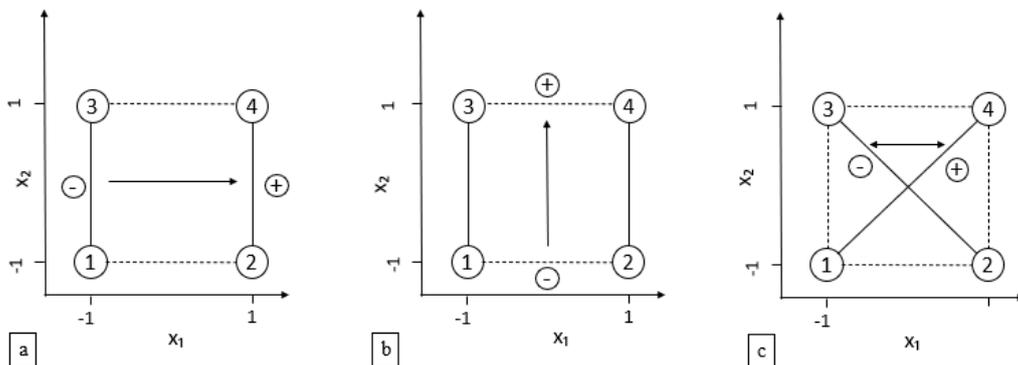


Figura 31. Representação geométrica dos efeitos em um planejamento para dois fatores (Neto *et al.*, 2010). O efeito individual é o contraste entre arestas opostas (a, b) e o efeito de interação é o contraste entre duas diagonais (c).

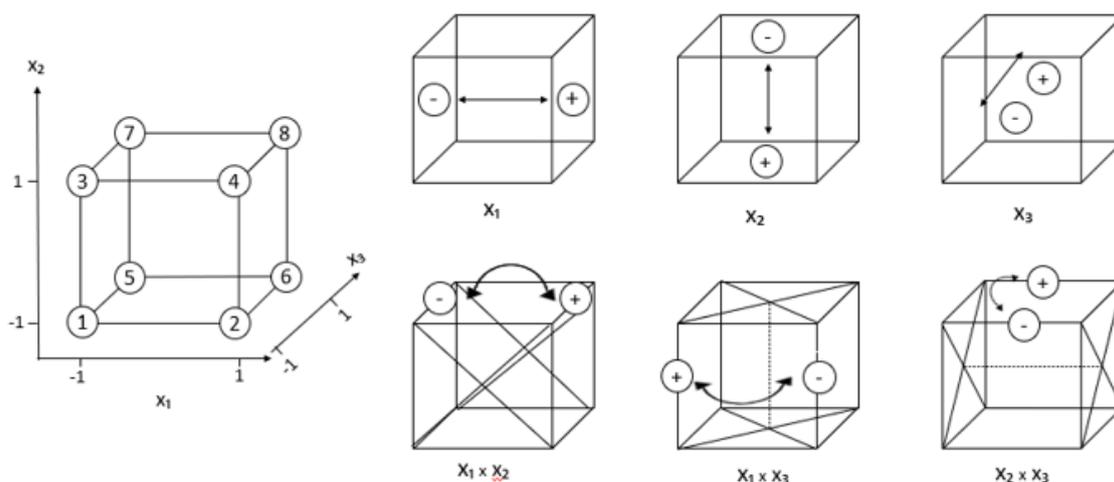


Figura 32. Representação geométrica dos efeitos em um planejamento para três fatores (Neto *et al.*, 2010).

Os pontos no sistema cartesiano assumem diferentes funções. Os fatoriais ajudam a estimar os termos lineares e a interação entre os fatores. E os axiais e centrais auxiliam a estimar os termos quadráticos. Com os pontos axiais e centrais é possível ajustar um modelo com curvatura, chamado de modelo quadrático de segunda ordem, descrito na equação 19. Além disso, realizar repetições no ponto central auxiliam na estimativa do erro aleatório.

$$\hat{y} = \beta_0 + \sum_{j=1} \beta_j x_j + \sum_{j=1} \beta_{jj} x_j^2 + \sum_{i < j} \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (19)$$

Onde o β_{ij} representa os termos quadráticos, que são responsáveis pela curva do modelo. Com isso, temos a equação 20, contendo a soma dos termos lineares ($\sum_{j=1} \beta_j x_j$), a soma dos termos quadráticos ($\sum_{j=1} \beta_{jj} x_j^2$) e dos termos de interação de segunda ordem ($\sum_{i < j} \beta_{ij} x_i x_j$) (Neto *et al.*, 2010):

$$\hat{y} = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{22} x_1 x_2 \quad (20)$$

Para avaliar numericamente a qualidade de um modelo utiliza-se a Análise de Variância (ANOVA). Nela são apresentadas o teste F, que testa a hipótese da variação do modelo; a soma quadrática (SS); a média quadrática (MS), que é obtida dividindo-se a SS pelo respectivo grau de liberdade (df) (Neto *et al.*, 2010).

Há diversos softwares que realizam a análise da superfície de resposta, dentre eles pode-se citar: o Minitab (Minitab, LCC®) e o Statística (StatSoft®).

11.2. Anexo II - Modelo CIE (1976)

Cada pessoa interpreta a cor de uma maneira diferente, mesmo que esteja olhando para o mesmo objeto (Ferreira e Spricigo, 2017). Com a criação de escalas de cores, pode-se representá-la numericamente com maior precisão. A escala de cores é uma representação geométrica tridimensional baseada nos atributos de tonalidade (cores da roda de cor: vermelho, amarelo, verde, entre outras), luminosidade (cores claras ou escuras) e saturação (cores opacas ou intensas). As cores podem ser visualizadas através de um determinado modelo. Cada modelo gera suas próprias cores (Guimarães, 2004). O modelo CMYK geralmente é empregado em impressoras e o RGB, HSV, HSL são utilizados em dispositivos que emitem luz, como computadores e televisão. Já o modelo CIE LAB e CIE LCH, definida pela *Commission Internationale de l'Eclairage* é utilizado para representar cores de objetos, pois proporciona maior uniformidade nas diferenças de cores (Guimarães, 2004).

A Figura 33 representa o modelo CIE LAB. Neste modelo é possível visualizar três eixos: um eixo vertical que corresponde a coordenada L^* e dois eixos perpendiculares que são as coordenadas a^* e b^* . Os sinais + e - indicam a direção das cores. No modelo, o L^* indica a escala de luminosidade, onde $+L^*$ indica a direção do branco e $-L^*$ a direção do preto. O a^* e o b^* são as coordenadas cromáticas, onde $+a^*$ indica a direção da cor vermelha e $-a^*$ verde; a coordenada $+b^*$ indica a direção do amarelo e $-b^*$ azul (Ferreira e Spricigo, 2017).

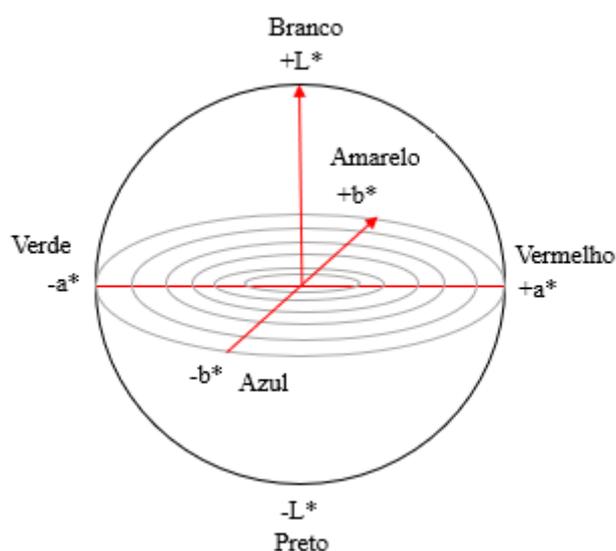


Figura 33. Representação do modelo CIE LAB e da direção dos eixos L^* , a^* e b^* (Adaptado de Ferreira e Spricigo, 2017).

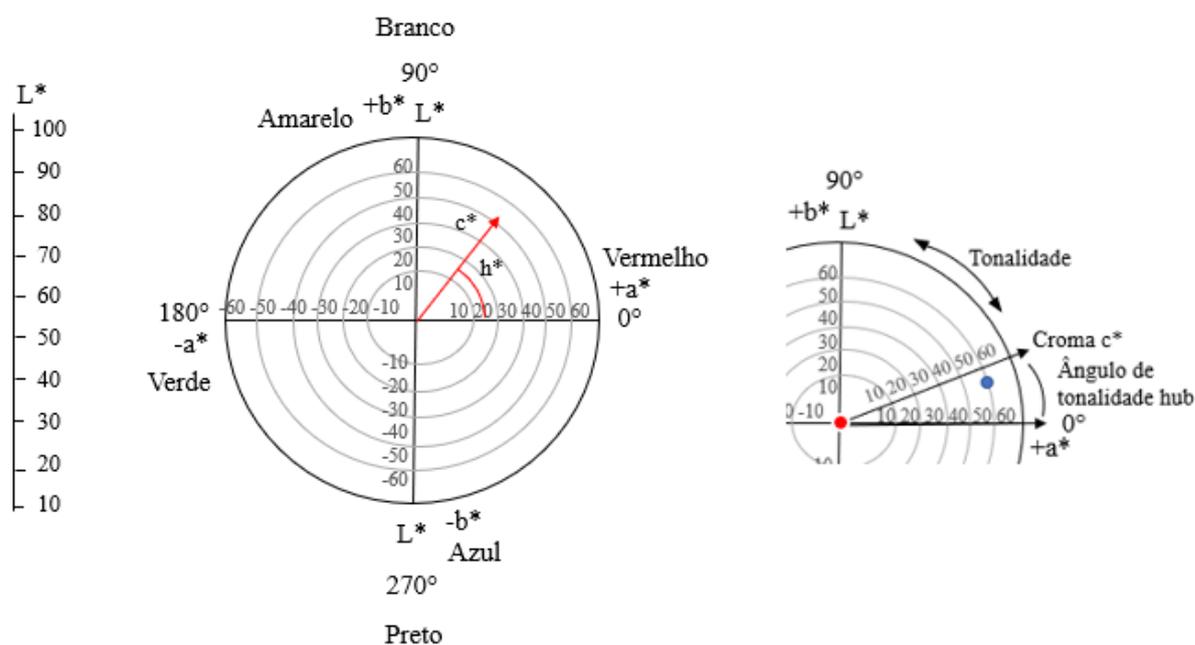


Figura 34. Representação do Diagrama das coordenadas cromáticas a^* e b^* (Adaptado de Leite, 2006).

O equipamento Colorímetro é corriqueiramente utilizado nas medições de cores dos objetos. Há a possibilidade de calcular os valores do modelo CIE LCH através dos resultados das medições na escala LAB (Ferreira e Spricigo, 2017).

Antes disso, é necessário entender o que significa o modelo LCH. Voltando a Figura 33, pode-se observar um diagrama com vários círculos. Essa representação é chamada de diagrama de cromaticidade ou diagrama das coordenadas cromáticas.

A Figura 34 representa o diagrama de cromaticidade. As coordenadas a^* e b^* citadas no exemplo acima estão representadas no diagrama de cromaticidade. O c^* , também chamado de saturação, representa a relação entre a^* e b^* . A saturação representa a intensidade de uma cor, o quanto ela aproxima-se ou afasta-se da cor branca (Scuri, 2002). Baixa saturação está presente em cores opacas e alta saturação em cores intensas. A tonalidade (h^*) está relacionada com os atributos como avermelhada ou esverdeada, por exemplo. O c^* sempre inicia no ponto zero (centro) do diagrama (onde está localizado a marcação vermelha) e o h^* (representado em graus) inicia no $+a$, que corresponde a cor vermelha. De acordo com o valor do seu ângulo, representará uma tonalidade diferente. Então a 0° ($+a$) representa a cor vermelha, a 90° amarelo ($+b$), 180° o verde ($-a^*$) e 270° azul ($-b^*$) (Ferreira e Spricigo, 2017, Minolta, 2021). No exemplo acima o h^* possui valor de $16,51^\circ$, então a sua tonalidade é avermelhada.

O modelo CIE LCH utiliza o mesmo diagrama do modelo LAB, portanto realizando-se a medição da cor de um objeto por meio de um Colorímetro pela escala LAB é possível calcular o c^* (croma) e o h^* (ângulo de tonalidade), através das equações 10 e 11, apresentadas anteriormente no capítulo IV. O valor da coordenada L^* será o mesmo do modelo LAB (Ferreira e Spricigo, 2017).

Por exemplo, na medição de cor de uma maçã com auxílio de um Colorímetro na escala LAB, obtêm-se os valores:

L^* 43,31

a^* 47,63

b^* 14,12.

Para obter os valores no modelo CIE LCH, através do exemplo anterior, utilizando-se as equações 10 e 11, encontra-se os valores do croma (c^*) e ângulo de tonalidade (h^*):

L^* 43,31

c^* 49,68

h^* 16,51