



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE BACHARELADO EM AGROECOLOGIA



BEATRIZ SARAIVA MARIANO

**ÓLEO ESSENCIAL DE LIMÃO PARA CONTROLE DO
BOLOR VERDE (*Penicillium digitatum* Sacc.) E BOLOR
AZUL (*Penicillium italicum* Wehmer)**

Araras/SP

2024



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE BACHARELADO EM AGROECOLOGIA



BEATRIZ SARAIVA MARIANO

**ÓLEO ESSENCIAL DE LIMÃO PARA CONTROLE DO
BOLOR VERDE (*Penicillium digitatum* Sacc.) E BOLOR
AZUL (*Penicillium italicum* Wehmer)**

Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em
Agroecologia/CCA/UFSCar para a obtenção do título
de Agroecólogo.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Patrícia Marluci da Conceição
Coorientador: Me. Fernando Trevizan Devite

Araras/SP

2024

**Dedico a Deus e aos meus pais,
Marisa e Sebastião.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, ao meu amado Bom Jesus, a Virgem Maria e ao Espírito Santo, que me sustentaram e conduziram até aqui.

Agradeço de todo coração aos meus pais, cujo apoio inabalável e sacrifício tornaram possível minha caminhada acadêmica. Ao meu namorado, Igor Afonso dos Santos, que me ajudou e acompanhou em todo esse percurso, com todo carinho e companheirismo.

Agradeço à Universidade Federal de São Carlos, pela excelência em ensino e pelas oportunidades proporcionadas ao longo dos anos. Agradeço aos professores que contribuíram para minha formação acadêmica e pessoal.

Agradeço à minha orientadora, Dr^a. Patrícia Marluci da Conceição, e meu coorientador, Me. Fernando Devite, pela orientação, sabedoria e incentivo, que foram essenciais para minha evolução como profissional e como pessoa. Além disso, agradeço à Dr^a. Vanessa Santos Moura por sua valiosa contribuição e apoio ao longo deste trabalho.

Agradeço ao Instituto Agrônomo de Campinas – Centro de Citricultura Sylvio Moreira (IAC/CCSM) e ao Dr. Fernando Alves de Azevedo, que me possibilitaram o ingresso como estagiária no CCSM, em que pude realizar minhas iniciações científicas, também ao grupo GD Citros, onde adquiri inúmeros conhecimentos e partilhei bons momentos com os colegas de grupo, além de que devo também agradecê-los por toda ajuda para que esse trabalho fosse possível.

Agradeço a toda minha família, que mesmo distante sempre me apoiou e esteve comigo. Agradeço aos meus colegas de graduação, por todos os momentos e em especial a Sabrina dos Santos Campos e Luana Carolina de Franco Petrônio, pela amizade e companheirismo durante todo esse percurso.

“Conhece-te, Aceita-te, Supera-te”

Santo Agostinho

RESUMO

Os bolores verde e azul, causados pelos fungos *Penicillium digitatum* Sacc e *Penicillium italicum* Wehmer, respectivamente, tem causado danos nos frutos cítricos, depreciando-os para o comércio *in natura*. Objetivou-se com este estudo avaliar o uso de óleos essenciais (OEs), extraídos de casca de limão (*Citrus limon* L. Burmann f.), no controle desses patógenos. Foram avaliados os OEs extraídos de quatro genótipos de limão: Amber, Eureka, Harvey e Siciliano. No experimento 1, o controle do *P. digitatum* pelos OEs foi testado *in vitro*, pelo método de difusão em ágar. O ensaio foi instalado em delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 4x3, sendo quatro genótipos de limão para extração do OE, três concentrações de OE (4, 8 e 16 $\mu\text{L mL}^{-1}$), com três repetições. As avaliações das placas foram realizadas, por sete dias. A porcentagem de inibição do crescimento micelial foi calculada para cada concentração em relação à testemunha. No experimento 2 foram realizados dois ensaios em pós-colheita para avaliação do controle dos fungos *P. digitatum* (1) e *P. italicum* (2) em frutos de lima ácida Tahiti. Os experimentos foram instalados em DIC, em esquema fatorial 2x4x3, sendo dois métodos de controle (preventivo e curativo), quatro genótipos de limão para extração do OE e três concentrações de OE (0, 8 e 16 $\mu\text{L mL}^{-1}$), com três repetições por concentração, e dez frutos por repetição. No tratamento preventivo foi aplicado em cada ferimento do fruto 20 μl da solução com OE + Tween 80 (1%) e, após 24 horas foi inoculado nos ferimentos 20 μl de uma suspensão do patógeno (1×10^3 conídios/ml para *P. digitatum* e 1×10^4 conídios/ml para *P. italicum*). No controle curativo, foram inoculados os fungos e depois as soluções com OE + Tween 80 (1%). Após a inoculação do patógeno foram realizadas as medições das lesões das doenças, ao longo de um período de sete dias. As medidas obtidas foram usadas para determinação da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD). Os dados das avaliações foram submetidos à análise de variância e comparados pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade. Observou-se no ensaio *in vitro* que não houve diferença estatística entre os genótipos, a partir do dia 4, nas concentrações de 8 e 16 μL . Nos ensaios pós-colheita, com o fungo *P. digitatum* (1), o genótipo Amber apresentou maior inibição fúngica na concentração de 16 μL . Para o fungo *P. italicum* (2), nas concentrações de 8 e 16 μL , a AACPD foi menor no método de controle curativo comparado ao preventivo. Conclui-se, no teste *in vitro*, que os OEs nas concentrações 8 e 16 μL apresentaram maior inibição do crescimento do *Penicillium digitatum*. Em pós-colheita, o genótipo Amber, na concentração 16 μL , método curativo, destacou-se pela maior inibição fúngica do *Penicillium digitatum*. O tratamento curativo mostrou superioridade na inibição dos fungos em comparação ao preventivo.

Palavras-chave: *Citrus limon*; pós-colheita, fungicida, lima ácida Tahiti.

ABSTRACT

Green and blue molds, caused by the fungi *Penicillium digitatum* Sacc and *Penicillium italicum* Wehmer, respectively, have caused damage to citrus fruits, devaluing them for fresh trade. The objective of this study was to evaluate the use of essential oils (EOs), extracted from lemon peel (*Citrus limon* L. Burmann f.), in the control of these pathogens. EOs extracted from four lemon genotypes were evaluated: Amber, Eureka, Harvey and Siciliano. In experiment 1, the control of *P. digitatum* by EOs was tested *in vitro*, using the agar diffusion method. The trial was carried out in a completely randomized design (DIC), in a 4x3 factorial scheme, with four lemon genotypes for EO extraction, three EO concentrations (4, 8 and 16 $\mu\text{L mL}^{-1}$), with three replications. Plaque evaluations were carried out for seven days. The percentage of inhibition of mycelial growth was calculated for each concentration in relation to the control. In experiment 2, two post-harvest tests were carried out to evaluate the control of the fungi *P. digitatum* (1) and *P. italicum* (2) on Tahiti acid lime fruits. The experiments were carried out in DIC, in a 2x4x3 factorial scheme, with two control methods (preventive and curative), four lemon genotypes for EO extraction and three EO concentrations (0, 8 and 16 $\mu\text{L mL}^{-1}$), with three repetitions per concentration, and ten fruits per repetition. In the preventive treatment, 20 μl of the solution with EO + Tween 80 (1%) was applied to each wound of the fruit and, after 24 hours, 20 μl of a suspension of the pathogen (1×10^3 conidia/ml for *P. digitatum* and 1×10^4 conidia/ml for *P. italicum*). In the curative control, fungi were inoculated and then solutions with EO + Tween 80 (1%). After pathogen inoculation, measurements of disease lesions were carried out over a period of seven days. The measurements obtained were used to determine the area under the disease progress curve (AACPD). The evaluation data were subjected to analysis of variance and compared using the Tukey test at 5% probability. It was observed in the *in vitro* test that there was no statistical difference between the genotypes, from day 4 onwards, at concentrations of 8 and 16 μL . In post-harvest trials, with the fungus *P. digitatum* (1), the Amber genotype showed greater fungal inhibition at a concentration of 16 μL . For the fungus *P. italicum* (2), at concentrations of 8 and 16 μL , the AACPD was lower in the curative control method compared to the preventive one. It was concluded, in the *in vitro* test, that EOs at concentrations 8 and 16 μL showed greater inhibition of the growth of *Penicillium digitatum*. In post-harvest, the Amber genotype, at a concentration of 16 μL , curative method, stood out for its greater fungal inhibition of *Penicillium digitatum*. Curative treatment showed superiority in inhibiting fungi compared to preventive treatment.

Keywords: Citrus limon; post-harvest, fungicide, Tahiti acid lime.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Genótipos de limão: Siciliano (A), Eureka (B), Harvey (C), Amber (D).18
- Figura 2.** A) Cascas no destilador. B) Aparelho tipo Moritz. Foto: Júlio Cesar S. Ronquim.19
- Figura 3.** A) Placas com meio BDA. B) Placa com micélio do fungo. C) Placas lacradas com filme plástico e identificadas.20
- Figura 4.** A) Perfuração dos frutos. B) Aplicação do óleo essencial. C) Caixas de propileno com frutos em câmara fria.22
- Figura 5.** Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) em avaliação pós-colheita de frutos de lima ácida Tahiti inoculados com fungo *Penicillium digitatum*.26
- Figura 6.** Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) em avaliação pós-colheita de frutos de lima ácida Tahiti inoculados com fungo *Penicillium italicum*.27
- Figura 7.** Comparação dos efeitos dos diferentes genótipos na inibição do bolor azul (*Penicillium italicum*).27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Percentual de inibição do crescimento do fungo <i>Penicillium digitatum</i>	24
---	----

Sumário

RESUMO.....	6
1. INTRODUÇÃO	11
2. HIPÓTESE.....	12
3. REVISÃO DE LITERATURA	12
3.1. Citricultura e os limões	12
3.2. Pós-Colheita e suas principais doenças em citros.....	13
3.3. Óleos essenciais e atividade antifúngica.....	15
4. OBJETIVOS	17
4.1. Objetivo geral	17
4.2. Objetivos específicos	17
5. MATERIAL E MÉTODOS	18
5.1. Extração dos óleos essenciais	18
5.2. Experimento 1 - Inibição <i>in vitro</i> do fungo <i>Penicillium digitatum</i>	19
5.3. Experimento 2 - Controle de <i>Penicillium digitatum</i> e <i>Penicillium italicum</i> em pós-colheita	20
5.4. Análise dos dados.....	22
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
6.1. Experimento 1 - Inibição <i>in vitro</i> do fungo <i>Penicillium digitatum</i>	22
6.2. Experimento 2 - Controle de <i>Penicillium italicum</i> e <i>Penicillium digitatum</i> em pós-colheita	25
7. CONCLUSÃO	28
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29

1. INTRODUÇÃO

A citricultura destaca-se globalmente como uma atividade agrícola, especialmente no Brasil, que ocupa uma posição proeminente entre as culturas frutíferas, contribuindo substancialmente tanto para o mercado interno de frutas frescas quanto para a exportação de suco concentrado, tanto em volume quanto em valor de produção (CARVALHO et al., 2019). O Brasil é o quarto maior produtor mundial de limas e limões, tendo produzido em torno de um milhão e sessenta e três mil toneladas, em 2022 (FAOSTAT, 2024). A Índia é a maior produtora mundial de limas e limões, alcançando uma produção de mais de três milhões e setenta e sete toneladas, em 2022 (FAOSTAT, 2024).

As doenças de pós-colheita, na citricultura, são um fator importante para a redução na quantidade de frutos disponíveis para o mercado consumidor, resultando em uma diminuição na qualidade ou quantidade de frutos, manifestando-se desde o momento da colheita até a chegada ao consumidor final (FISCHER et al., 2007). Os fungos, responsáveis pelos bolores, são os principais agentes etiológicos causadores de perdas na pós-colheita, variando entre 25% e 50% da produção total (SPADARO, DROBY, 2016).

Assim, os principais bolores responsáveis pelos danos em pós-colheita, são o bolor verde, causado pelo fungo *Penicillium digitatum* Sacc. e o bolor azul, *Penicillium italicum* Wehmer. Para combater esses patógenos têm sido adotadas práticas agrícolas para reduzir o inóculo no campo, como o tratamento químico, a irradiação e a termoterapia (FRANCO, BETTIOL, 2002). Os fungicidas químicos como o tiabendazol e imazalil são amplamente utilizados para minimizar as perdas ocorridas em frutos na pós-colheita, isoladamente ou misturados (BOUBAKER et al., 2009). No entanto, alternativas têm sido pesquisadas para diminuir a dependência de fungicidas químicos, uma dessas medidas pesquisadas tem sido os óleos essenciais (OEs).

Vários estudos comprovam o efeito de OEs extraídos de plantas que atuam como fungicidas naturais, inibindo a atividade de fungos e não deixando resíduos tóxicos ao homem (PEREIRA et al., 2006; ARAÚJO NETO et al., 2012). Estes atuam tanto pela ação fungitóxica direta, inibindo o crescimento micelial e a germinação de esporos, quanto pela indução de fitoalexinas nas plantas, indicando a presença de compostos com características de elicitores (SALGADO et al., 2003; BRUM et al., 2012; BIGATON et al., 2013).

Os OEs podem ser extraídos de plantas através da hidrodestilação por arraste a vapor, na grande maioria das vezes, e pela prensagem do pericarpo de frutos cítricos. Flores, folhas, cascas, rizomas e frutos são matérias-primas para sua produção, a exemplo dos OEs de rosas, eucalipto, canela, gengibre e laranja, respectivamente. Os OEs possuem grande aplicação na perfumaria, cosmética, alimentos e como coadjuvantes em medicamentos (BIZZO et al.,

2009).

Em citros, os OEs são geralmente obtidos por prensagem a frio, como subproduto do processo de fabricação de suco (BIASI, DESCHAMPS, 2009) e por arraste a vapor (SIMAS et al., 2015) e, em geral, contém grandes quantidades de terpenos, sendo o d-limoneno o principal componente desta fração (BERGER et al., 2002). O OE de limão é um dos mais importantes agentes odorizantes, largamente usado em perfumaria, bebidas alcoólicas, refrigerantes, doces, balas, sorvetes, gelatinas e massas (TEIXEIRA et al, 2013), podendo ser usado na indústria farmacêutica e materiais de limpeza (SIMAS et al., 2015), apresentando atividades antimicrobianas (BAKKALI et al., 2008, TRANCHIDA et al., 2012).

Assim, o OE surge como uma possível alternativa ao tratamento químico tradicional, para o manejo do bolor verde (*P. digitatum*) e do bolor azul (*P. italicum*), onde a utilização de fungicidas sintéticos é um dos principais métodos de controle, podendo selecionar fungos fitopatogênicos resistentes (SILVA et al., 2008b).

2. HIPÓTESE

A aplicação de OEs extraídos da casca de limão, em concentrações específicas, exercerão atividade antifúngica sob os fungos *P. digitatum* e *P. italicum*, causador do bolor verde e bolor azul, respectivamente, permitindo o desenvolvimento de novos produtos, à base de OEs, como uma alternativa que possa ser utilizada na pós-colheita dos citros.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Citricultura e os limões

A cadeia produtiva de citros desempenha um papel vital na estrutura agroindustrial do Brasil, sendo crucial para a economia do país em virtude da demanda econômica gerada pela comercialização das frutas. Além de impulsionar a arrecadação de receitas, esse setor exerce uma influência na criação de empregos, tanto de maneira direta quanto indireta, contribuindo de maneira notável para o equilíbrio da balança comercial nacional, tanto no fortalecimento do capital quanto no desenvolvimento regional (ZULIAN et al., 2013).

Tratando-se da produção mundial de citros, a China é o maior produtor mundial seguida pelo Brasil e União Europeia, sendo que a laranja é a principal fruta cítrica cultivada no mundo (VIDAL, 2021). Mediante aos limões e limas, o maior produtor mundial é a Índia, tendo produzido em torno de sessenta e um milhões de toneladas, em 2022 (FAOSTAT, 2024).

A origem de muitas plantas cítricas, como os limões e limas pode ser rastreada até a

Ásia (PREVIDELI, ALMEIDA, 2020). Estes frutos, compõe o gênero *Citrus*, sendo o maior dentro da família *Rutaceae*, abrangendo plantas perenes que podem ser arbustos ou árvores, variando de 3 a 15 metros de altura. Essas plantas possuem folhas coriáceas, ovais ou elípticas, e algumas apresentam espinhos (KLIMEKSZCZYKUTOWICZ, SZOPA, EKIERT, 2020).

O limão (*Citrus lemon* L. Burmann f.), chamado de limão verdadeiro, é fonte vitamina C, B1, B2, B3 fibras, várias outras vitaminas e minerais. Uma de suas principais substâncias é o d-limoneno, encontrado na casca, se trata de um dos constituintes dos óleos essenciais. Além de que, estes frutos possuem flavonoides, com ação antioxidante, que são responsáveis por determinar a atividade biológica do *C. lemon* (VIEIRA, et al. 2017; KODJOH, 2022).

Portanto, muitos usos são atribuídos ao limão, seja na indústria alimentícia para produção de suco concentrado, rico em potássio e vitamina C, usado em refrigerantes, bebidas alcoólicas, bolos e doces. Também são utilizados para obtenção de óleos essenciais, pectina e ácido cítrico, este que é usado na fabricação de queijos e geleias, na conservação e branqueamento de alimentos (SILVA, 2008a).

3.2. Pós-Colheita e suas principais doenças em citros

O período pós-colheita compreende desde a colheita das frutas no campo até o seu consumo em estado *in natura*, preparado ou transformado industrialmente. A qualidade dos frutos, incluindo cítricos, depende de fatores intrínsecos e manipulações durante a colheita. A "qualidade potencial" no momento da colheita pode ser preservada ou deteriorada com tratamentos subsequentes. Processos como colheita, transporte e processamento impactam a vida pós-colheita, mesmo com tecnologias avançadas. Portanto, como desafio busca-se minimizar estresses para garantir que os frutos cheguem ao destino mantendo suas características originais (POZZAN, 2004).

Chitarra e Chitarra (1990) classificam as perdas pós-colheita em três categorias: fisiológicas (inevitáveis e ligadas a fatores internos), mecânicas (ferimentos aumentam as perdas fisiológicas) e microbiológicas (ataques de microrganismos, especialmente fungos em citros). A aparência externa dos frutos é crítica para os consumidores, superando às vezes as características organolépticas. Os autores Ghooshkhaneh, Golzarian, Mamarabadi (2018) afirmam que evitar pragas e doenças que afetem o aspecto visual é crucial durante a produção no campo. Além de que, reduzem o período de prateleira e a qualidade dos frutos.

Para preservar a qualidade dos frutos frescos após a colheita, é necessário armazená-los em condições adequadas de temperatura e umidade relativa. Assim, a refrigeração

destaca-se como uma estratégia eficaz para preservar a qualidade e prolongar a disponibilidade comercial dos produtos hortifrutícolas. As principais funções desse processo incluem a retardação dos processos metabólicos, a diminuição da desidratação e da ocorrência de podridões (BRACKMANN et al. 2008).

Além disso, é crucial realizar uma higienização apropriada e a desinfestação dos locais de armazenamento dos frutos, para reduzir os riscos associados aos inóculos de patógenos presentes na superfície da fruta proveniente do campo (VERO et al., 2016). Segundo Fischer et al. (2008), a quantidade de esporos presente nas instalações de processamento de citros desempenha um papel decisivo nos níveis de deterioração, especialmente no caso das causadas por patógenos que penetram por meio de ferimentos.

Os problemas causados pelas podridões, representam a principal fonte de danos no pós-colheita de frutas cítricas, manifestando-se desde o momento da colheita até a chegada ao consumidor final. As principais doenças que ocorrem no pós-colheita de citros são os bolores verde e azul, causados por *P. digitatum* e *P. italicum*, respectivamente, de maneira secundária tem-se outras doenças, como as podridões pedunculares (*Diaporthe citri* e *Lasiodyplodia spp.*), a podridão negra (*Alternaria spp.*), a podridão-parda (*Phytophthora spp.*) e a podridão azeda (*Geotrichum citri-aurantii*) (JUNIOR et al., 2015).

O bolor verde, ocorre em todas as regiões do mundo, manifesta-se principalmente em laranjas e tangerinas. A infecção ocorre através de ferimentos que atuam como porta de entrada para o patógeno (NASCIMENTO et al., 2014). Esse fungo libera esporos de forma abundante, encontrados em frutas contaminadas, e se dispersam ao longo de diversas etapas, incluindo no campo, durante o processo de embalagem, resfriamento, transporte e armazenamento. Os sintomas iniciais se manifestam através de manchas suaves e aquosas, seguidas por presença de micélio branco e esporos de tonalidade verde-oliva. A região de esporulação é circundada por halos compostos de micélio branco e aquoso. À medida que a deterioração avança, a totalidade da fruta é envolvida por uma quantidade considerável de esporos, os quais se dispersam facilmente pelo ar (FISCHER et al., 2008). A temperatura ótima para desenvolvimento da doença está entre 20 e 25 °C (BURITICÁ et al. 2019).

O bolor azul, acomete todas as regiões produtoras de citros do mundo, e todas as variedades cítricas, todavia em locais em que a temperatura se encontra acima de 10°C, a doença se torna menos efetiva (BURITICÁ et al., 2019). Dentre os sintomas estão, podridões moles nos frutos, recobrando-os com micélio branco e grande número de esporos com a coloração azul, com o passar do tempo, o local do sintoma, torna-se esverdeado, se assemelhando com o bolor verde. Em frutas armazenadas, a podridão azul pode se propagar de um fruto para outro por meio do contato, já que enzimas produzidas pelo fungo dissolvem

a cutícula do fruto adjacente (LARANJEIRA et al., 2005). A progressão da doença atinge seu ponto ideal em temperaturas de 22 a 24 °C; no entanto, é mais prevalente em frutas armazenadas em condições refrigeradas (PLAZA et al. 2003).

As espécies de *Penicillium* se alimentam absorvendo substâncias orgânicas provenientes de matéria orgânica em decomposição em pomares e em outros ambientes, na fase de conídios. A propagação das infecções tem sua origem nos conídios carregados pelo vento, que alcançam os frutos, penetrando por meio de ferimentos. No entanto o *P. italicum* consegue adentrar através da cutícula. Se tratando de doenças de pós-colheita, os bolores possuem maior relevância econômica, afetando principalmente frutos em estágios avançados de maturação. Todavia, os frutos também podem ser acometidos durante a colheita, nas atividades de processamento, armazenamento e transporte (KIMATI et al., 1997).

O manejo dos fungos pós-colheita envolve a aplicação de produtos químicos, como fungicidas, para diminuir os inóculos na superfície dos frutos, inibindo a esporulação e dispersão de esporos. O controle de patógenos como *P. italicum* e *P. digitatum*, responsáveis pelos bolores azuis e verdes, depende do uso regular de fungicidas químicos. Esse método pode levar ao desenvolvimento de resistência nos patógenos, devido a seletividade dos fungicidas, que aumentam sua eficiência sistêmica, mas também os tornam vulneráveis. Isso acontece, pois, os fungos podem desenvolver resistência com o uso frequente de fungicidas químicos com o mesmo princípio ativo, além de apresentar riscos toxicológicos, incluindo a mortalidade de organismos não-alvo e impactos ambientais (BERGAMIN, AMORIM, 2011; TALIBI et al., 2014).

Atualmente, buscam-se abordagens alternativas para o controle dos fungos pós-colheita, como evidenciado no estudo de Zhang et al. (2022). Nesse trabalho, foram avaliados produtos biológicos, incluindo o uso de um produto fermentado derivado de *Aspergillus aculeatus*, que demonstrou eficácia antifúngica contra *P. italicum*. Adicionalmente, em suas pesquisas, Benato et al. (2018) constataram que a exposição de *P. digitatum* a distintas concentrações de óleos essenciais, como os provenientes de capim-limão, canela e palma-rosa, resultou na redução do crescimento do patógeno.

3.3. Óleos essenciais e atividade antifúngica

Óleos essenciais são líquidos aromáticos extraídos de plantas (flores, botões, sementes, folhas, galhos, cascas, ervas, madeira, frutos e raízes) por diversos métodos, todavia o mais comum é a destilação a vapor. O termo "óleo essencial" foi cunhado por Paracelsus von Hohenheim no século XVI. Cerca de 3.000 óleos são conhecidos, com aproximadamente 300 sendo comercialmente relevantes. Alguns desses possuem

propriedades antimicrobianas (BURT, 2004). Estes são substâncias voláteis presentes nas plantas, reconhecíveis pelo seu odor característico, e consistem em misturas complexas de terpenos, sesquiterpenos, e outros compostos (SIMÕES et al., 2007).

Os óleos essenciais, extraídos de órgãos vegetais, desempenham funções cruciais para a sobrevivência das plantas em seus ambientes naturais. Contribuem significativamente na defesa contra microrganismos, predadores e atração de polinizadores. As bolsas secretoras são encontradas em diversas partes da planta, sendo sua localização uma característica distinta entre grupos botânicos. A volatilidade e insolubilidade em água, juntamente com a solubilidade em solventes orgânicos, permitem sua identificação e isolamento (COSTA, 1994).

A origem desses compostos se dá através de dois precursores distintos: o acetil-CoA e o ácido chiquímico. O acetil-CoA é o precursor dos terpenoides, que representam a maior parte da composição química dos óleos essenciais. Por outro lado, o ácido chiquímico serve como precursor dos fenilpropanoides, que são compostos aromáticos (GOMES, 2011). O d-limoneno, componente principal dos OEs, se trata de um terpeno, sua síntese se dá a partir do acetil-CoA, faz parte de uma grande classe do metabolismo secundário, extraído de frutos cítricos, possui propriedades anticancerígenas, atuando na morte das células cancerosas e inibindo seu crescimento. Além disso, é utilizado como herbicida, inseticida e fungicida, tendo diversas aplicações industriais, como solvente e matéria-prima para compostos químicos. Na indústria farmacêutica e alimentícia, é empregado como componente aromático e saborizante (STEFFENS, 2010).

Os compostos presentes nos OEs têm o potencial de agir diretamente nos patógenos, modificando o potencial transmembrana, diminuindo a síntese de ATP e causando danos significativos no DNA e nas mitocôndrias. Essas ações levam ao controle do desenvolvimento de fungos fitopatogênicos, reduzindo o crescimento micelial, a esporulação e a germinação dos esporos. Além disso, é destacado que componentes presentes nos óleos essenciais podem ativar mecanismos de defesa nas plantas, proporcionando resistência contra patógenos (BAKKALI et al., 2008; MAZARO et al., 2008; PIATI et al., 2017). Conforme apontado por Lopes et al. (2001), certos terpenos encontrados nos óleos essenciais têm a capacidade de tornar a membrana celular do fungo permeável, resultando no escape de seu conteúdo.

A composição química dos óleos essenciais pode ser influenciada por vários fatores, incluindo região geográfica, clima, tipo de solo, exposição solar e níveis de precipitação. Essas variáveis resultam em diferentes quimiotipos, que se referem à mesma espécie, subespécie ou variedade de um organismo, mas que apresentam distintos metabólitos

secundários ou a mesma composição, porém em diferentes quantidades (POLATOGLU, 2013).

Quanto a obtenção dos óleos, a destilação por arraste a vapor é o método mais tradicional utilizado para extração. Amplamente empregada pela indústria devido à sua vantagem econômica em comparação com métodos mais avançados, como a extração com fluido supercrítico, a técnica de destilação por arraste a vapor envolve a vaporização a temperaturas mais baixas do que as de ebulição dos componentes voláteis, induzida por uma corrente direta de vapor de água. Os vapores resultantes permeiam o material vegetal no extrator, passam pelo condensador para liquefação e, finalmente, são separados em um decantador. A distribuição eficiente da matéria-prima no extrator é crucial para otimizar o contato superficial com o vapor (CASSEL, VARGAS, 2006).

Os principais atores globais no mercado de OEs incluem a Índia, os EUA, a França, a China e o Brasil, quando consideramos valores econômicos. No entanto, em relação aos volumes exportados, a Espanha assume o lugar da França entre os cinco primeiros (BIZZO, REZENDE, 2022). A contribuição do Brasil nesse cenário é especialmente notável devido aos óleos essenciais de cítricos, que são derivados da indústria de sucos (BIZZO et al., 2009).

Devido ao emprego constante de fungicidas sintéticos, tem crescido uma pressão, especialmente de países desenvolvidos, para evitar o uso desses produtos. Diante desse cenário desafiador, uma alternativa altamente desejável em relação aos métodos tradicionais de tratamento químico é a adoção de abordagens baseadas em produtos naturais. Portanto, surgem os óleos essenciais, que tem demonstrado capacidade conclusiva em inibir o desenvolvimento de diversos fitopatógenos de natureza fúngica (GOMES, 2011).

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Avaliar o uso de OEs, extraídos de casca de limão, no controle do *P. digitatum*, causador do bolor verde e *P. italicum*, causador do bolor azul.

4.2. Objetivos específicos

1. Avaliar a inibição *in vitro* do crescimento micelial do fungo *P. digitatum*, ocasionada pelos OEs, extraídos de casca de limão, em diferentes concentrações.
2. Avaliar a eficácia dos OEs, extraídos de casca de limão, no controle preventivo e curativo do bolor verde e bolor azul, em frutos de lima ácida Tahiti, em pós-colheita.

5. MATERIAL E MÉTODOS

Uma Coleção de Trabalho de Citros foi estabelecida em 2015/2016 em uma área total de 29 hectares no Centro de Citricultura Sylvio Moreira do Instituto Agrônomo (IAC) em Cordeirópolis-SP, nas coordenadas geográficas: 22° 32' de latitude sul e 47° 27' de longitude-oeste, altitude de 639 m, clima do tipo Cwa, de acordo com o sistema internacional de Köppen, e com solo classificado como Latossolo Vermelho Escuro-Distrófico, textura argilosa.

Nessa área, 720 acessos foram implantados, contendo representantes de diferentes grupos hortícolas (tangerinas, clementinas, tangores, laranjas, limas doces, limas ácidas, limão e diferentes grupos de porta-enxertos) enxertados em limão Cravo. Dessa coleção selecionou-se para este trabalho quatro genótipos de limão: Siciliano (Figura 1 A); Eureka (Figura 1 B); Harvey (Figura 1 C) e Amber (Figura 1 D).

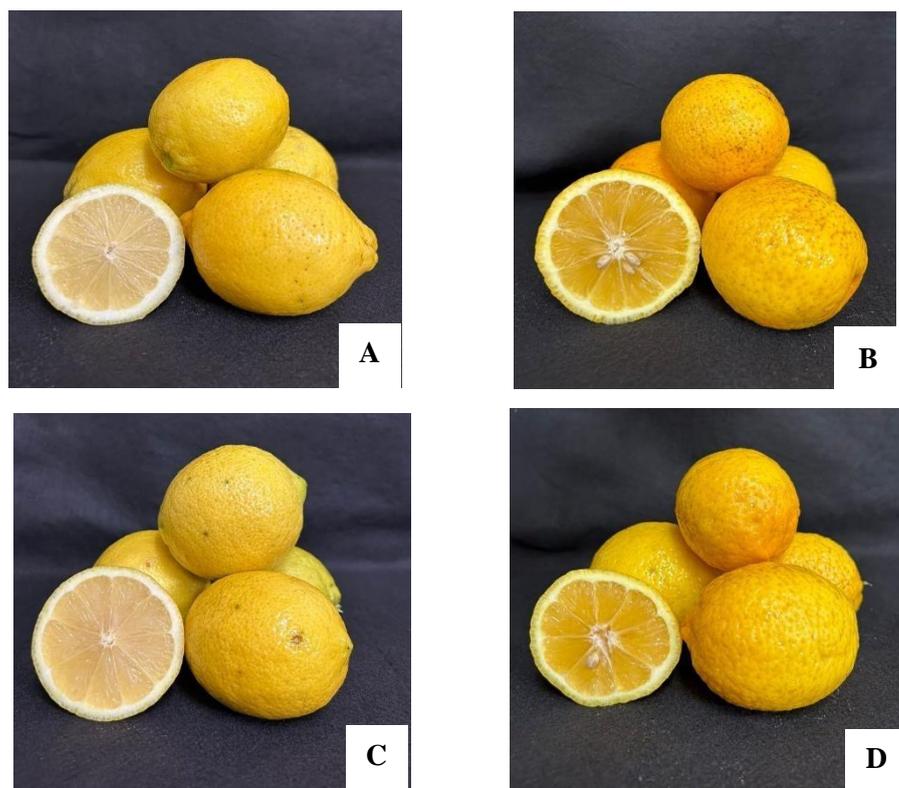


Figura 1. Genótipos de limão: Siciliano (A), Eureka (B), Harvey (C), Amber (D).

5.1. Extração dos óleos essenciais

Para extração dos OEs foram coletados 80 frutos maduros de cada genótipo. Os frutos foram lavados e descascados, mantendo o albedo na casca. As cascas foram picotadas manualmente em pedaços de 1 cm² e foram colocadas no hidroddestilador (Figura 2 A). Os OEs foram extraídos por hidroddestilação por arraste a vapor utilizando-se um aparelho tipo Moritz (Figura 2 B), com aproximadamente 300 gramas de cascas, por um período de 3 horas

(Teixeira et al., 2013). Após a extração, os OEs foram coletados e armazenados em frascos âmbar (protegidos da luz), à 4° C.



Figura 2. A) Cascas no destilador. B) Aparelho tipo Moritz. Foto: Júlio Cesar S. Ronquim.

5.2. Experimento 1 - Inibição *in vitro* do fungo *Penicillium digitatum*

Para a realização do experimento foram utilizados isolados de *P. digitatum* e *P. italicum*, pertencentes à coleção de microrganismos do Laboratório de Fitopatologia e Controle Biológico do Centro de Citricultura “Sylvio Moreira” /Instituto Agrônomo de Campinas, Cordeirópolis - São Paulo, Brasil. A colônia de *P. digitatum* foi cultivada em meio BDA e mantida em estufa B.O.D. a 25°C± 2°C, com fotoperíodo 12h/12h, por sete dias.

O ensaio foi instalado em delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 4x3, sendo quatro genótipos de limão (Harvey, Amber, Siciliano e Eureka) para extração do óleo e três concentrações de óleo (4, 8 e 16 µL mL⁻¹), com três repetições.

A ação antifúngica dos OEs foi avaliada pelo método de difusão em ágar por cavidade em placa (MENDONÇA, 2004). Para essa avaliação foram adicionados em placas de Petri, de 9 cm de diâmetro, aproximadamente 20 mL do meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) (Figura 4 A). Para cada concentração foi adicionado ao meio de cultura, com uma micropipeta, as concentrações de 0 (testemunha), 4, 8 e 16µL mL⁻¹ do OE junto com Tween 80 na proporção de 1% do volume do meio. Após a solidificação do meio de cultura, um disco invertido de 8 mm de diâmetro contendo o micélio do fungo, foi depositado no centro de cada placa (Figura 4 B).

As placas foram lacradas com filme plástico, identificadas (Figura 4 C) e incubadas em câmara de germinação sob fotoperíodo de 12 horas, à temperatura de 27°C. As avaliações foram realizadas, por sete dias, por medições diametralmente opostas (média de duas medidas diametralmente opostas) do crescimento micelial do fitopatógeno. A porcentagem

de inibição do crescimento micelial foi calculada para cada concentração em relação à testemunha, utilizando a seguinte equação:

$$Pi = (dc - dt) \times 100/dc$$

Em que, Pi = Percentual de inibição do crescimento, dc = O diâmetro médio da colônia do fungo no controle, dt = O diâmetro médio da colônia do fungo no tratamento.

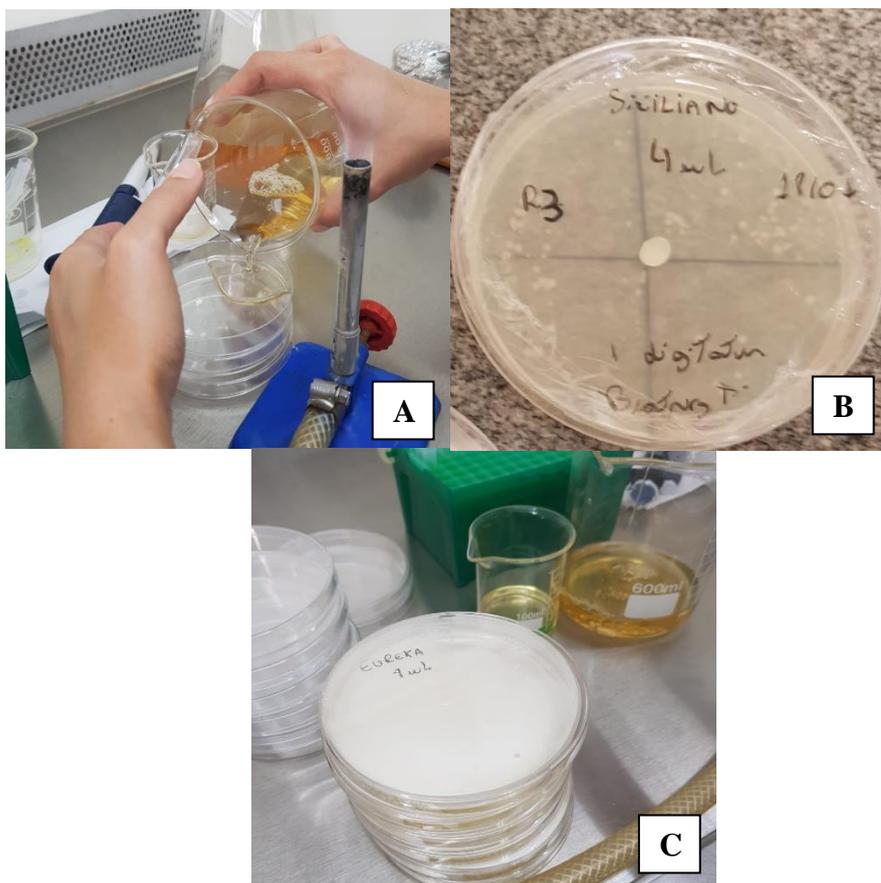


Figura 3. A) Placas com meio BDA. B) Placa com micélio do fungo. C) Placas lacradas com filme plástico e identificadas.

5.3. Experimento 2 - Controle de *Penicillium digitatum* e *Penicillium italicum* em pós-colheita

Neste experimento foram utilizados isolados de *P. digitatum* e *P. italicum*, pertencentes à coleção de microrganismos do Laboratório de Fitopatologia e Controle Biológico do Centro de Citricultura “Sylvio Moreira” /Instituto Agrônomo de Campinas, Cordeirópolis - São Paulo, Brasil. As colônias de *P. digitatum* e *P. italicum* foram cultivadas em meio BDA e mantidas em estufa B.O.D. a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, com fotoperíodo 12h/12h, por sete dias. As suspensões do fungo foram obtidas através da técnica de diluição seriada em água destilada autoclavada, obtendo-se uma concentração final de 1×10^3 conídios/ml para *P.*

digitatum e 1×10^4 conídios/ml para *P. italicum*, ajustada com auxílio de uma câmara de Neubauer.

Assim avaliou-se o controle dos fungos *P. digitatum* (ensaio 1) e *P. italicum* (ensaio 2), com o uso de OEs, em frutos maduros de lima ácida Tahiti (*Citrus latifolia* Tanaka). Os frutos foram desinfetados superficialmente com hipoclorito de sódio, a 2%, por dois minutos e, feridos em dois pontos equidistantes, na região equatorial dos frutos, com agulhas esterilizadas a uma profundidade de três milímetros (Figura 5 A). Os experimentos foram instalados em DIC, em esquema fatorial $2 \times 4 \times 3$, sendo dois métodos de controle (preventivo e curativo), quatro genótipos de limão para extração do OE (Amber, Eureka, Harvey e Siciliano) e três concentrações de OE (0, 8 e $16 \mu\text{l ml}^{-1}$), com três repetições por concentração, e dez frutos por repetição.

No tratamento preventivo foi aplicado em cada ferimento do fruto $20 \mu\text{l}$ da solução com OE + Tween 80 (1%) (Figura 5 B). Após 24 horas foi inoculado nos ferimentos $20 \mu\text{l}$ de uma suspensão (1×10^3 conídios/ml) de *P. digitatum* (ensaio 1), e (1×10^4 conídios/ml) de *P. italicum* (ensaio 2). Para o controle curativo foram inoculados os fungos ($20 \mu\text{l}$) nas perfurações, e após 24h, foram aplicadas no mesmo local $20 \mu\text{l}$ das soluções com OE + Tween 80 (1%). Para as testemunhas foram inoculadas as suspensões do fungo, sendo utilizado água destilada ao invés dos OEs + Tween 80.

Após a inoculação do fungo, os frutos foram armazenados em caixas de propileno com tampa ($40 \times 30 \times 15$ cm) sendo mantidos em uma câmara refrigerada a uma temperatura de $10^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ e 90% de UR (Figura 5 C). Após a inoculação do patógeno as observações foram realizadas ao longo de um período de sete dias, utilizando-se um paquímetro para auxiliar na medição do diâmetro das lesões formadas (comprimento e largura). As medidas obtidas foram usadas para determinação da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), utilizando a equação proposta por Shaner e Finney (1977):

$$\text{AACPD} = \sum [(y_i + y_{i+1}) / 2 \times (t_{i+1} - t_i)]$$

Onde, y_i é o diâmetro de uma lesão no tempo t_i , em dias, e Y_{i+1} é o diâmetro da lesão no tempo $t_i + 1$.

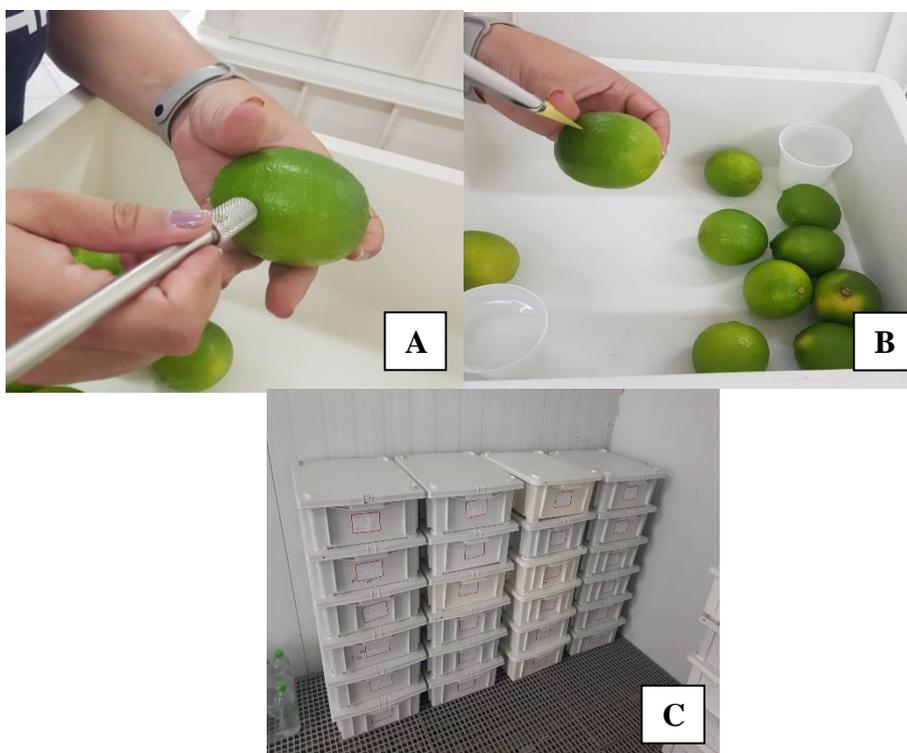


Figura 4. A) Perfuração dos frutos. B) Aplicação do óleo essencial. C) Caixas de propileno com frutos em câmara fria.

5.4. Análise dos dados

Os dados das avaliações foram submetidos à análise de variância e comparados pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Experimento 1 - Inibição *in vitro* do fungo *Penicillium digitatum*

O óleo extraído do genótipo Amber proporcionou maior inibição do crescimento micelial do fungo, na concentração de 4 μL , em relação aos demais genótipos, nos dias 2 e 3. Na concentração 8 μL não houve diferença no percentual de inibição entre os genótipos, exceto no dia 3, que o genótipo Eureka foi inferior aos demais genótipos. Na concentração 16 μL não houve diferença no percentual de inibição entre os genótipos, exceto no dia 2, que o genótipo Eureka foi superior aos demais genótipos (Tabela 1). Assim, observou-se que a partir do dia 4, nas concentrações 8 e 16 μL , não houve diferença entre os genótipos no percentual de inibição (Tabela 1).

O genótipo Amber não apresentou diferença entre as concentrações na inibição do crescimento micelial do fungo, nos sete dias de avaliação (Tabela 1). Os genótipos Eureka, Harvey e Siciliano apresentaram maior inibição nas concentrações de 8 e 16 μL , em relação à concentração de 4 μL , no dia 6 (Tabela 1). Há trabalhos na literatura que também observaram aumento da inibição do crescimento de patógenos em concentrações maiores de OE. Tao, Jia e Zhou (2014) conduziram avaliações utilizando difusão em ágar com OE de *Citrus reticulata* Blanco. Eles observaram que concentrações de 2,50 $\mu\text{L mL}^{-1}$ inibiram completamente o crescimento micelial de *Penicillium italicum*, enquanto concentrações de

40,0 $\mu\text{L mL}^{-1}$ foram necessárias para inibir *Penicillium digitatum*. Este estudo revelou que os OEs reduzem ou impedem totalmente o crescimento dos fungos de maneira dependente da concentração.

A capacidade antifúngica dos OEs pode ser explicada por fatores referentes a sua composição. Tao, Jia e Zhou (2014) e Gomes (2011) atribuíram a atividade antifúngica a componentes como os hidrocarbonetos e monoterpênicos, sendo o limoneno, octanal e citral, presentes no OE de frutos cítricos. Segundo os autores, esses componentes mostram-se eficientes no controle do *P. italicum* e *P. digitatum*. Sharma e Tripathi (2008), que testaram OE de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck contra *Aspergillus niger* afirmam que os OEs são capazes de modificar a parede celular e a retração do citoplasma nas hifas causando a morte do micélio. Tais modificações induzidas pelos OEs podem estar relacionadas à interferência dos componentes do OE nas reações enzimáticas de síntese da parede, o que afeta a morfogênese e o crescimento dos fungos.

Tabela 1. Percentual de inibição do crescimento micelial do fungo *Penicillium digitatum*.

		Percentual de Inibição do Crescimento													
Genótipos	Concentração ($\mu\text{l mL}^{-1}$)	Dias													
		1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7
Amber	4	100	aA	46,8	aA	40,5	aA	31,9	aA	41,2	aA	38,4	aA	39,1	aA
	8	100	aA	60,4	aA	41,1	aA	29,1	aA	39,9	aA	36,3	aA	35,9	aA
	16	100	aA	65,6	bA	49,4	aA	28,2	aA	34,7	aA	33,9	aA	33,4	aA
Eureka	4	100	aA	13,5	bB	-3,5	bB	-10,2	bB	-8,0	bB	-6,8	bB	-2,5	bB
	8	100	aA	30,2	aB	18,2	bB	34,8	aA	32,5	aA	33,2	aA	31,5	aA
	16	100	aA	100,0	aA	52,9	aA	46,7	aA	44,6	aA	39,9	aA	35,9	aA
Harvey	4	100	aA	3,1	bB	2,3	bB	-9,8	bB	1,4	bB	2,6	abB	9,0	abB
	8	100	aA	57,2	aAB	37,6	aA	35,2	aA	34,8	aA	36,3	aA	35,1	aAB
	16	100	aA	62,5	bA	42,3	aA	37	aA	37,7	aA	42,7	aA	43,9	aA
Siciliano	4	100	aA	6,2	bB	12,3	bB	12,	abA	23,0	abA	18,0	abB	19,2	abA
	8	100	aA	25,0	aAB	34,1	aA	27,4	aA	30,8	aA	32,0	aA	29,1	aA
	16	100	aA	27,0	bA	37,0	aA	32,7	aA	35,4	aA	31,3	aA	29,6	aA

*Médias seguidas da mesma letra minúscula entre genótipos dentro da mesma concentração, e letras maiúsculas entre concentração dentro da mesmo genótipo, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

6.2. Experimento 2 - Controle de *Penicillium italicum* e *Penicillium digitatum* em pós-colheita

No controle da doença bolor verde (*Penicillium digitatum*) (ensaio 1) nas concentrações de 0, 8 e 16 μL não houve diferença entre os genótipos, no método preventivo (Figura 6). Na concentração de 8 μL , no método curativo, o OE extraído do genótipo Siciliano propiciou maior AACPD (menor inibição do crescimento da doença) em comparação com os OE extraídos do Eureka e Harvey (Figura 6).

Na concentração de 16 μL , no método curativo, o genótipo Amber propiciou menor AACPD (maior inibição do crescimento da doença) em comparação aos demais genótipos. Nessa concentração o genótipo Amber teve menor AACPD no método curativo comparado ao preventivo (Figura 6).

O genótipo Amber apresentou o menor valor de AACPD (maior inibição do crescimento da doença), no método de controle preventivo e curativo, na concentração 16 μL (Figura 6). O genótipo Eureka apresentou menor valor de AACPD (maior inibição do crescimento da doença), no método de controle preventivo, na concentração 16 μL , e no método de controle curativo, nas concentrações 8 e 16 μL (Figura 6). Os genótipos Harvey e Siciliano apresentaram menor valor de AACPD, nos métodos preventivo e curativo, na concentração 16 μL , comparado a concentração 0 μL (testemunha) (Figura 6).

Os resultados desse trabalho corroboram com os obtidos por Mattos (2010) que avaliou o efeito do OE extraído de casca de lima ácida Tahiti (*Citrus latifolia* Tanaka), no controle do fungo *Penicillium digitatum*, em que as concentrações de 10.000 ppm e 100.000 ppm foram eficientes em controlar o bolor verde em laranjas 'Pêra' em pós-colheita. Constatando-se que o óleo utilizado nas concentrações mais elevadas, ocasiona maior controle da doença. Segundo Benato et al. (2018), que testou OEs de capim-limão, palmarosa e canela contra *P. digitatum* em frutos de laranja 'Perá' e 'Valência', constatou que a efetividade dos OEs se intensifica com o aumento da concentração.

No controle da doença bolor azul (*Penicillium italicum*) (ensaio 2) nas concentrações de 8 e 16 μL , houve uma diminuição no diâmetro médio da lesão nos frutos tratados curativamente em comparação aos frutos tratados de forma preventiva, no entanto ambos os métodos de tratamento diferiram da testemunha (Figura 7). O genótipo Eureka apresentou maior valor de AACPD (menor inibição do crescimento da doença) comparado aos genótipos Harvey e Siciliano (Figura 8).

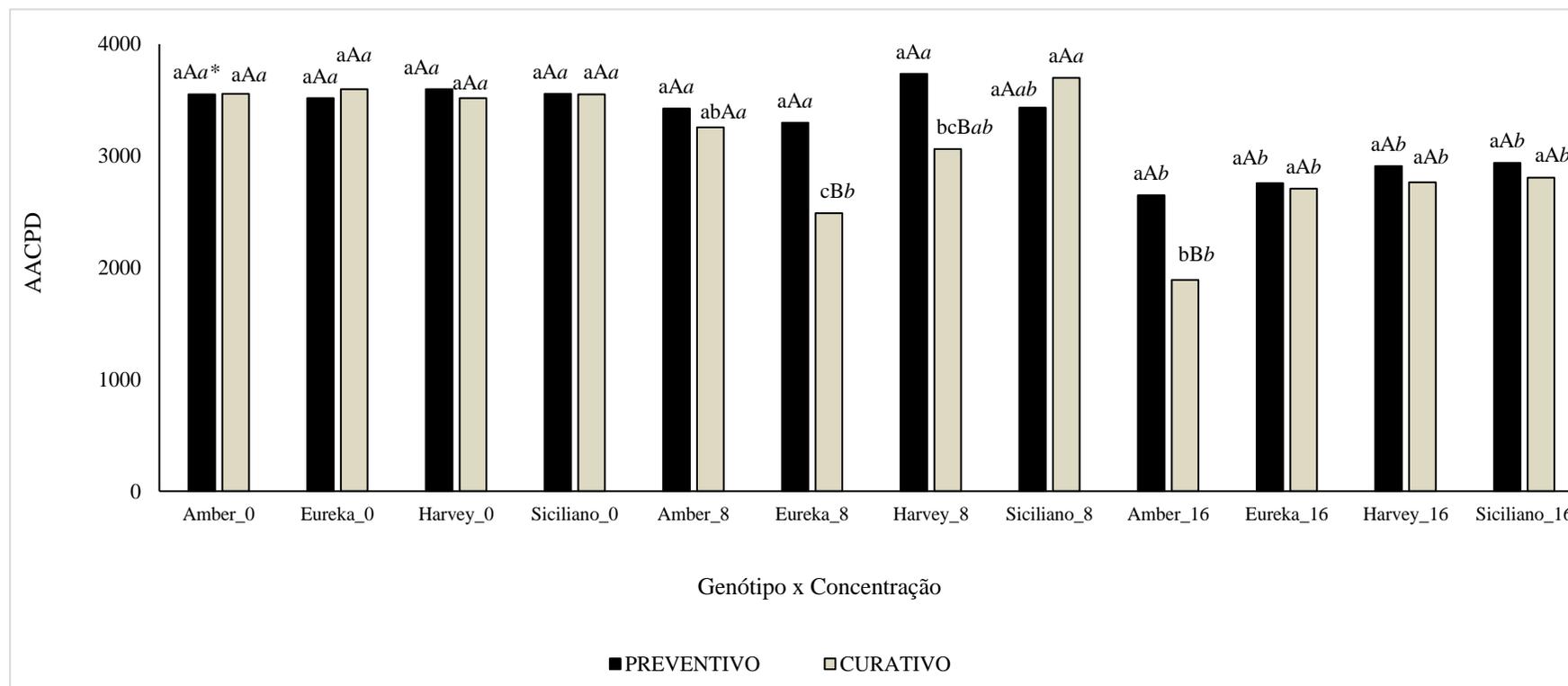


Figura 5. Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) em avaliação pós-colheita de frutos de lima ácida Tahiti inoculados com fungo *Penicillium digitatum*.

*Médias seguidas das mesmas letras minúsculas entre genótipos no mesmo método de controle e mesma concentração, maiúsculas entre métodos de controle para o mesmo genótipo e mesma concentração e *itálicas* entre concentrações dentro da mesma combinação genótipo/método de controle, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

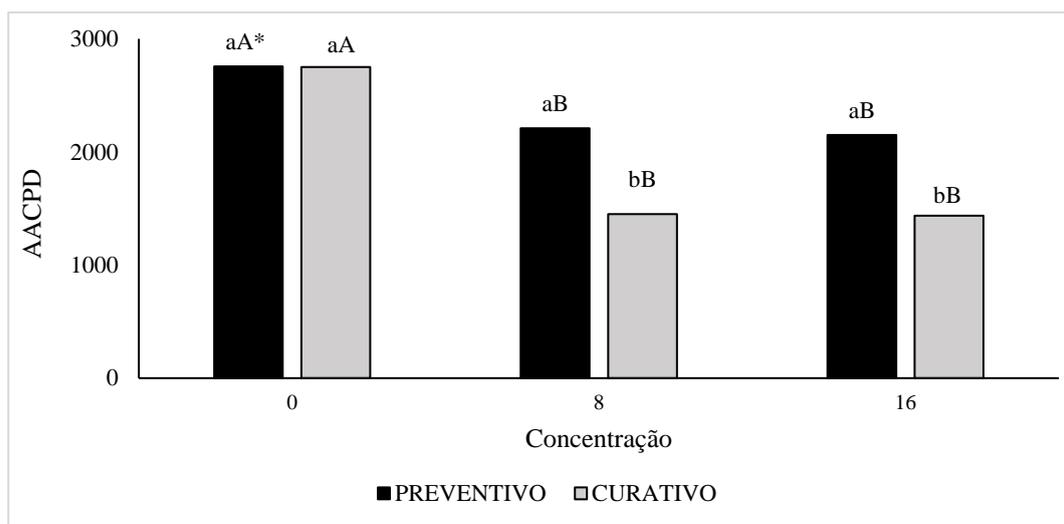


Figura 6. Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) em avaliação pós-colheita de frutos de lima ácida Tahiti inoculados com fungo *Penicillium italicum*.

*Médias seguidas das mesmas letras minúsculas entre métodos de controle e mesma concentração e maiúsculas para o mesmo método de controle e diferentes concentrações, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

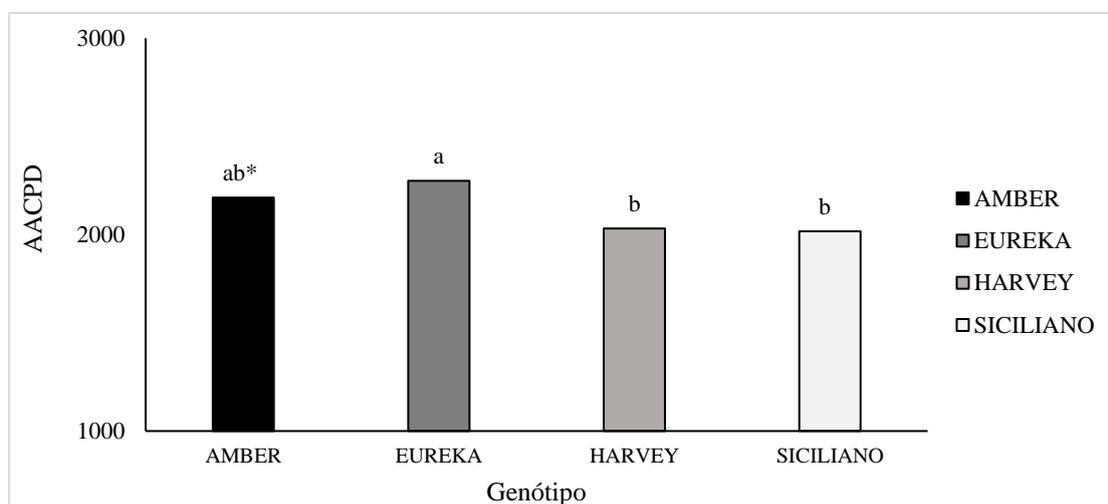


Figura 7. Comparação dos efeitos dos diferentes genótipos na inibição do bolor azul (*Penicillium italicum*).

*Médias seguidas da mesma letra minúscula, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Avaliando os resultados observa-se que o Amber se destacou pela diminuição do diâmetro média da lesão do fungo *Penicillium digitatum*, na concentração 16 µL, método curativo (Figura 6). No entanto, no controle do fungo *Penicillium italicum* esse genótipo não apresentou a mesma efetividade (Figura 8). Caccioni et al. (1998) avaliaram a efetividade de OEs de diferentes genótipos de citros no controle dos fungos *P. italicum* e *P. digitatum*. Segundo os autores, a efetividade dos óleos varia entre os genótipos de onde foram extraídos. A composição química única de cada OE pode influenciar sua eficácia contra cada fungo.

O limoneno, predominante nos OEs atinge concentrações de 90 a 96%, porém quando combinado com citral, sua eficácia como fungicida aumenta, indicando o citral como o composto mais ativo contra *P. digitatum* e *P. italicum* (CACCIONI et al., 1998). Assim, com a variação da composição química dos OEs, a resposta dos fungos aos óleos varia.

Nos OEs extraídos dos genótipos Amber, Eureka e Siciliano há predominância de limoneno, além dos compostos beta pipeno e gama terpeno (MAIA, LANDINI, 2014). Assim como o limoneno, o beta pipeno possui atividade antifúngica, sendo capaz de destruir a integridade celular de leveduras (ANDRADE, 2017), enquanto gama terpeno também possui propriedades antimicrobianas (CLEFF, 2008).

Para *Penicillium digitatum* e *Penicillium italicum* observou-se que a menor severidade da doença foi ocasionada no método de controle curativo (Figuras 6 e 7). Quando falamos sobre os diferentes métodos de controle (preventivo e curativo), alguns estudos trazem o método curativo como sendo mais eficiente em frutos. Benato et al. (2018) e Soyulu et al. (2019) destacam a eficácia do controle curativo sobre o preventivo. Os autores sugerem que os componentes voláteis dos óleos podem ser responsáveis pelo melhor efeito curativo, pois são mais facilmente absorvidos pelo fungo.

7. CONCLUSÃO

No teste *in vitro*, os OEs nas concentrações 8 e 16 µL apresentaram maior inibição do crescimento micelial do *Penicillium digitatum*.

Em pós-colheita, o genótipo Amber, na concentração 16 µL, método curativo, destacou-se pela maior inibição do bolo verde, causado pelo fungo do *Penicillium digitatum*.

O tratamento curativo mostrou superioridade na inibição da doença em comparação ao preventivo.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, A. C. de M. **Atividade antifúngica do (+)- α -pineno E (+)- β -pineno isolados e associados sobre *Candida spp.* de interesse clínico para cavidade bucal.** f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2017.

ARAÚJO NETO, A.C.A. *et al.* Óleo essencial de anis na incidência e controle de patógenos em sementes de erva-doce (*Foeniculum vulgare Mill.*). **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Mossoró, v. 7, n. 1, p. 170-176, 2012.

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

BERGER, R.G. *et al.* Biotechnological flavours generation. In: Taylor AJ (Ed). **Food Flavour Technology**. Sheffield Academica Press, Sheffield, p. 60-104, 2002.

BENATO, E. A. *et al.* Óleos essenciais e tratamento térmico no controle pós-colheita de bolor verde em laranja. **Summa Phytopathologica**, 44, 65-71, 2018.

BERGAMIN FILHO, A., AMORIM, L., R. Importância das doenças de plantas. **In: Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. Agronômica Ceres, São Paulo, 2011.

BIASI, L.A.; DESCHAMPS, C. Plantas aromáticas do cultivo à produção de óleo essencial. **Layer Studio Gráfico e Editora Ltda**, Curitiba, p. 160, 2009.

BIGATON, D. *et al.* Avaliação da atividade fungicida de extratos e óleos essenciais sobre ferrugem asiática da soja. **Revista Ciência Agronômica**, v. 44, n. 4, p. 757- 763, 2013.

BIZZO, H.R. *et al.* Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 588-594, 2009.

BIZZO, H. R., REZENDE, C. M. O mercado de óleos essenciais no Brasil e no mundo na última década. **Química Nova**, v. 45, p. 949-958, 2022.

BOUBAKER H. *et al.* Sensitivity of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* to imazalil and thiabendazole in Morocco. **Plant Pathology Journal**, Suwon, v.8, p.152-158, 2009.

BRACKMANN, A. *et al.* Temperatura e Umidade Relativa na Qualidade da tangerina “Montenegrina” Armazenada. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 2, p. 340-344, 2008.

BRUM, R. B.C. S. **Efeito de óleos essenciais no controle de fungos fitopatogênicos**. 2012. 135 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Campus Universitário de Gurupi, Universidade Federal do Tocantins, Gurupi, 2012.

BURITICÁ J. R. *et al.* Guia ilustrada de enfermidades en poscosecha de frutas y verduras y sus agentes causantes em Colombia. **Academia Colombiana de Ciencias Exactas**, Bogotá, D.C., v.38, 506p, 2019.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 94, n. 3, p. 23-253, 2004.

CACCIONI, D. R. L. *et al.* Relationship between volatile components of citrus fruit essential oil and antimicrobial action on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. **International Journal of Food Microbiology**, v.43, p.73-79, 1998.

CASSEL, E., VARGAS, R. M. F. Experiments and modeling of the *Cymbopogon winterianus* essential oil extraction by steam distillation. **J. Mex. Chem. Soc.** v. 55, p. 57-60, 2006.

CARVALHO, S. A. *et al.* Avanços na propagação dos Citros no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 41, 2019.

CHITARRA, M. I. F., CHITARRA, A. B. Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio. **ESAL/FAEPE**, Lavras, p. 320, 1990.

CLEFF, M. B. **Avaliação da atividade antifúngica do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. frente a fungos de importância em veterinária com ênfase em *Candida* spp. f.** Dissertação (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

COSTA, A. F. Farmacognosia. Lisboa: **Fundação Calouste Gulbenkian**, v. 1, p. 1031, 1994.

FAOSTAT - Food and Agriculture Organization of the United Nations. Data Production and Trade. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/>. Acesso em: 14 fev. 2024.

FISCHER, I. H. *et al.* Caracterização dos danos pós-colheita em citros procedentes de "packinghouse". **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, p. 304-310, 2007.

FISCHER I. H. *et al.* Doenças pós-colheita em citros e caracterização da população fúngica ambiental no mercado atacadista de São Paulo. **Tropical Plant Pathology** 33: 219-226, 2008.

FRANCO, D. A. DE S., BETTIOL, W. Efeito de produtos alternativos para o controle do bolor verde (*Penicillium digitatum*) em pós-colheita de citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, p. 569-572, 2002.

GHOOSHKHANEH, N. G., GOLZARIAN, M. R., MAMARABADI, M. Detection and classification of citrus green mold caused by *Penicillium digitatum* using multispectral imaging. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, n. 9, p. 3542-3550, 2018.

GOMES, M. S. **Caracterização química e atividade antifúngica dos óleos essenciais de cinco espécies do gênero *Citrus***. 98 f. Dissertação (Mestrado em agroquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

JUNIOR, G.J.S. *et al.* Doenças em espécies florestais e frutíferas. Capítulo- Doenças limitantes na citricultura Brasileira: manejo atual e perspectivas. **Grupo de estudos avançados em fitopatologia**, Viçosa, 2015.

KIMATI, H. *et al.* **Manual de fitopatologia Volume 2: Doenças das plantas cultivadas**. Editora Agronômica Ceres Ltda, São Paulo, 2017.

KLIMEK-SZCZYKUTOWICZ M., SZOPA A., EKIERT H. *Citrus limon* (Lemon) Phenomenon—A Review of the Chemistry, Pharmacological Properties, Applications in the Modern Pharmaceutical, Food, and Cosmetics Industries, and Biotechnological Studies. **Plants**, v. 9, n. 1, p. 119, 2020.

KODJOH, E. M. W. **Atividade terapêutica de óleo essencial de limão siciliano (*Citrus***

lemon (L) Burn): uma revisão da literatura. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Federal de Campina Grande, 2022.

LARANJEIRA F. F. *et al.* Fungos, procariotos e doenças abióticas. In: Citros. Campinas: **Instituto Agronômico/Fundag**, cap 18. p. 522-523, 2005.

LOPES, D. *et al.* Avaliação química dos óleos essenciais de exemplares de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC.) do Estado do Acre Rio Branco: **Embrapa-CPAF/AC**, p. 75, 2001.

MAIA, N. B., LANDINI C. J. Óleos Essenciais de Plantas Cítricas. Holambra, SP: **Editora Setembro**, 2014.

MATTOS, L. P. V. DE. **Controle de *Guignardia citricarpa* e *Penicillium digitatum* em laranja com óleos essenciais e agentes de biocontrole.** 142 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, 2010.

MAZARO, S. M. *et al.* Indução de fitoalexinas em cotilédones de soja em resposta a derivados de folhas de pitangueira. **Ciência Rural**, 38(7), 1824-1829, 2008.

MENDONÇA A. T. **Efeito dos óleos essenciais de condimentos sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* em ricota cremosa.** 2004. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.

NASCIMENTO L. M. *et al.* Colheita e Pós-colheita de Citros. 1a Ed. São Paulo/Rio de Janeiro: **Livre Expressão**, 2014.

PEREIRA, M. C. *et al.* Inibição do desenvolvimento fúngico através da utilização de óleos essenciais de condimentos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n.4, p.731-738, 2006.

PIATI, A. *et al.* Efeito do óleo essencial de eucalipto sobre *Penicillium digitatum*. **Revista Acadêmica: Ciência Animal**, 11, 19-26, 2017.

PLAZA P. *et al.* Effect of water activity and temperature on germination and growth of

Penicillium digitatum, *P. italicum* and *Geotrichum candidum*. **Journal of Applied Microbiology** 94: 594-554, 2003.

POLATOGLU, K. “Chemotypes” – A fact that should not be ignored in natural product studies. **The Natural Products Journal**, vol. 3, p. 10-14, 2013.

POZZAN, M. Problemas fitossanitários e de resíduo de agrotóxicos na pós-colheita de citros. **Revista: Visão agrícola-ESALQ**, n. 2. 2004.

PREVIDELI, F. D., DE ALMEIDA, M. M. Y. O Mercado “*In Natura*” do Limão Tahiti. **Revista Interface Tecnológica**, v. 17, n. 1, p. 409-416, 2020.

SALGADO, A. P. S. *et al.* Avaliação da atividade fungitóxica de óleos essenciais de folhas de *Eucalyptus* sobre *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* e *Bipolaris sorokiniana*. **Ciência Agrotécnologia**, Lavras, v. 27, n. 2, p.249-254, 2003.

SHANER, G, FINNEY RE. The Effect of Nitrogen Fertilization on the Expression of Slow-Mildewing Resistance in Knox Wheat. **Phytopathology**, 1997.

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

SILVA, P. R. *et al.* Caracterização da cultura do limão no Estado de São Paulo. 2001-2007, **Informações Econômicas SP**, v.38, n.7, 2008a.

SILVA, M. B. *et al.* Ação antimicrobiana de extratos de plantas medicinais sobre espécies fitopatogênicas de fungos do gênero *Colletotrichum*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 10, n. 3, p. 57-60, set. 2008b.

SIMAS, D. L. R. *et al.* Caracterização dos óleos essenciais de frutas cítricas. **Citrus Research & Technology**, Cordeirópolis, v.36, n.1, p.15-26, 2015.

SIMÕES M. T. F. *et al.* Influência do tempo de destilação no rendimento, na composição

química e na actividade antioxidante e antimicrobiana do óleo essencial: os casos de *Pterospartum tridentatum* e *Laurus nobilis*. **Actas do II Colóquio Nacional de Plantas Aromáticas e Medicinais**, Associação Portuguesa de Horticultura, p. 203-216, 2007.

SOYLU, E. M. *et al.* *In vitro* and *in vivo* antifungal activities of the essential oils of various plants against tomato grey mould disease agent *Botrytis cinerea*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.143, n. 183–189, 2010.

SPADARO, D., DROBY, S. Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: The importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. **Trends in Food Science & Technology**, v. 47, p.39-49, 2016.

STEFFENS, A. H. **Estudo da composição química dos óleos essenciais obtidos por destilação por arraste a vapor em escala laboratorial e industrial**. f. Dissertação (Mestrado em engenharia e tecnologia de materiais). Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

TALIBI, I. *et al.* Alternative methods for the control of postharvest *Citrus* diseases. **Journal of Applied Microbiology**, 117(1), 1-17, 2014.

TAO, N., JIA, L., ZHOU, H., Anti-fungal activity of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum*, **Food Chemistry**, v. 153, 2014.

TEIXEIRA, J. P. F. *et al.* Composição química de óleos essenciais de quinze génotipos de limão em duas épocas de colheita. **Citrus Research & Technology** v. 34, n. 2, p.65-74, 2013.

TRANCHIDA P. Q. *et al.* Analysis of *Citrus* essential oils: state of the art and future perspectives. **Flavour and Fragrance Journal**. v. 27, p. 98-123, 2012.

VERO S. *et al.* Controle biológico de doenças em pós-colheita. **IN: de Almeida halfeld-vieira, Bernardo et al. Defensivos Agrícolas Naturais: uso e perspectivas**. Brasília, Embrapa, 2016.

VIDAL, M. D. F. Produção de Laranja na Área de Atuação de BNB. **Caderno Setorial**

ETENE. Ano 6, n° 198, 2021.

VIEIRA, G. B. *et al.* O limão e seus usos. **Mostra Interativa da Produção Estudantil em Educação Científica e Tecnológica**, 2017.

ZHANG, J. *et al.* Evaluation of *Aspergillus aculeatus* GC-09 for the biological control of *Citrus* blue mold caused by *Penicillium italicum*. **Fungal Biology**, 126(3), 201-212, 2022.

ZULIAN, A. *et al.* Citricultura e agronegócio cooperativo no Brasil. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, 11, 2291-2306, 2013.