



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
AGROECOLOGIA E DESENVOLVIMENTO RURAL**

**CONTROLE DA PODRIDÃO AZEDA EM FRUTOS CÍTRICOS ATRAVÉS DE  
MÉTODOS ALTERNATIVOS**

**BIANCA IKARI MACHADO**

**Araras**

**2018**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
AGROECOLOGIA E DESENVOLVIMENTO RURAL**

**CONTROLE DA PODRIDÃO AZEDA EM FRUTOS CÍTRICOS ATRAVÉS DE  
MÉTODOS ALTERNATIVOS**

**BIANCA IKARI MACHADO**

ORIENTADOR: Profa. Dra. KATIA CRISTINA KUPPER

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agroecologia e Desenvolvimento Rural como requisito parcial à obtenção do título de MESTRE EM AGROECOLOGIA E DESENVOLVIMENTO RURAL

Araras

2018

## FICHA CATALOGRÁFICA

Ikari Machado, Bianca

Controle da podridão azeda em frutos cítricos através de métodos alternativos / Bianca Ikari Machado. -- 2018.

61 f. : 30 cm.

Dissertação (mestrado)-Universidade Federal de São Carlos, campus Araras, Araras

Orientador: Katia Cristina Kupper

Banca examinadora: Patricia Cia, Mariângela Critofani-Yali

Bibliografia

1. Citrus spp. 2. Sporobolomyces koalae. 3. quitosana. I. Orientador. II. Universidade Federal de São Carlos. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelo Programa de Geração Automática da Secretaria Geral de Informática (SIn).

DADOS FORNECIDOS PELO(A) AUTOR(A)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO  
DE  
BIANCA IKARI MACHADO

APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
AGROECOLOGIA E DESENVOLVIMENTO RURAL, DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 20 DE FEVEREIRO DE 2018.

BANCA EXAMINADORA:



KATIA CRISTINA KUPPER

ORIENTADORA

INSTITUTO AGRONÔMICO DE CAMPINAS



PATRICIA CIA

INSTITUTO AGRONÔMICO DE CAMPINAS



MARIÂNGELA CRISTOFANI-YALI

INSTITUTO AGRONÔMICO DE CAMPINAS

*“Grandes coisas são feitas aos poucos”  
(Vincent Van Gogh)*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos bons espíritos por sempre estarem comigo e me ajudarem, de alguma forma a trilhar o meu caminho, me guiando com a certeza de que o pior momento é sempre instante para ser melhor.

À senhora minha mãe **Eliana Fernandes Ikari**, pelo amor incondicional diário, por toda paciência, afeto e compreensão, me inspirando sempre a aceitar os desafios, buscando o bem e a felicidade mesmo nas horas mais sombrias, me lembrando sempre de acender a luz. Obrigada por não me deixar desistir mãezinha.

Aos meus irmãos **Bruna Fernandes Ikari Machado** e **João Pedro Ikari Machado**, por me amarem mesmo e sempre, por acreditarem em mim e primarem pelos meus estudos. Obrigada por me incluírem em seus planos e por estarmos sempre juntos no pensamento.

À minha avó **Margarida Fernandes de Freitas** e meus padrinhos **Helena Rodrigues Borégio** e **Egberto Borégio**, e toda minha família, pelo amor, pelo acolhimento, carinho, e pelos esforços imensuráveis para que todas as minhas etapas pudessem ser concluídas com muito sucesso, paz, muito amor e alegria.

À **Katia Cristina Kupper**, minha orientadora e parceira de trabalho, por me incentivar a ter garra todos os dias, pelo auxílio e orientação fornecidos durante a pós-graduação, pelas conversas e conselhos, pela amizade e paciência. Obrigada pela confiança depositada em mim e nos meus cronogramas.

À **Universidade Federal de São Carlos – UFSCAr/Araras** por ampliar meus horizontes e ser a realização de um sonho.

Aos amigos e funcionários do **Programa de Pós-Graduação em Agroecologia e Desenvolvimento Rural**, por muito contribuírem com a construção do meu conhecimento, em especial a **Cris** e **Sirlene**, sempre atenciosas, solícitas e gentis.

Ao **CNPq**, pela oportunidade de efetivar o meu projeto ao longo desses dois anos, pelo auxílio financeiro ao projeto e pela concessão de bolsa.

Aos meus bons e eternos amigos, irmãos da vida, por engrandecerem minha alma, fazendo tudo valer a pena, por me mostrarem que a vida é uma constante mudança e que cabe a nós decidirmos se embarcaremos nela, em especial **Aline Pomba**, **Amanda Petroni**, **Diogo Tiago**, **Fernando Puertas**, **Janaina Rodrigues**, **Lais Lazaro**, **Leonardo Uchoa**, **Lucas Aires**, **Michele Ennes**, **Patricia Postingel**, **Patrícia Bonert**, **Raissa Mazareli**, **Sarah Djorge**, **Thiago Patrick**, **Veridianna Pattini**, e aos amigos do **Ai Sai Coelho**.

Aos amigos conterrâneos de Araçatuba, por me acompanharem a tantos anos e não hesitarem nunca na amizade e no amor, por toda força e incentivo nessa fase tão intensa, em especial **Camila Antunes**, **Cristiana Greggio**, **Hiandra Franco**, **Juliana Elias**, **Letícia Bracho**, **Michele Priscila**, **Rodrigo Rapozo**, **Thamires Cavazana**, **Thiago Grassi**, **Verônica Honda**.

Às minhas *roommates* de Araras **Isabella Tanganini**, **Isis Carvalho**, **Letícia Kuster Mitre** e **Reinaldo Rodrigues** pela convivência e pela paciência diária e por cuidarem de mim sempre.

À todos os amigos do Laboratório de Fitopatologia e Controle Biológico, pela parceria no dia-a-dia, pelas colaborações no trabalho, por estarem sempre dispostos e por aguentarem o meu som.

Obrigada pela amizade, em especial **Andreia Fujimoto, Ariane Carmo, Débora Estevan, Flávia Lino, Luriany Ferraz, Mariana Klein, Vanessa Santos, Wesley Fialho.**

Aos estagiários que passaram pelo laboratório **Amanda Roston, João Jortieke, Lilian Vieira, Lorena Sala, Luan Burger, Mariana Pettini, Mariane Basseti, Paulo Barreta, Rafael Kupper Moretto e Vitor Bueno,** que muito me ajudaram, auxiliando nos meus experimentos como se fossem seus. Obrigada por sempre estarem tão dispostos e por tornarem os meus dias mais divertidos, sem vocês não seria possível.

Ao meu terapeuta e amigo **Wilson,** por me fazer ver as coisas com outros olhos, aceitar cada uma das mudanças e enxergar as recompensas.

Aos meus amigos do **Centro de Pesquisa Mokiti Okada, Aleçandra Fialho, Camila Kiritani, Isabel Souza,** e **Valdinei Giassi,** pela paciência ao me iniciarem na microbiologia, e especialmente a **Evanir Almeida Ferreira,** por toda técnica laboratorial ensinada a mim com muito carinho e amizade e que fizeram toda a diferença durante o desenvolvimento do meu projeto.

Ao **Centro de Citrcultura Sylvio Moreira,** por abrir as portas e dar toda a estrutura para o desenvolvimento dos experimentos. A todos os funcionários do IAC, que se tornaram amigos, em especial **Genésio, Gomes, Isabel, Maria, Nadji, Nidelci, Queque, Valéria, Vivian,** por toda ajuda, disponibilidade, simpatia e gentileza.

Á **Citrícola Lucato** e as **Fazendas Raphael Juliano** pela doação dos frutos em todos os experimentos.

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	1
2.	REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1	Agroecologia e Desenvolvimento Rural.....	3
2.2.	Citricultura.....	4
2.3.	Doenças de pós-colheita .....	7
2.3.1.	<i>Geotrichum citri-aurantii</i> .....	8
2.4.	Métodos alternativos de controle .....	10
2.4.1.	Controle Biológico.....	11
2.4.2.	Termoterapia .....	13
2.4.3.	Quitosana .....	14
3.	MATERIAL E MÉTODOS .....	16
3.1.	Frutos .....	16
3.2.	Microrganismos .....	16
3.3.	Quitosana .....	17
3.4.	Utilização de diferentes doses de guazatine no desenvolvimento micelial de <i>Geotrichum citri-aurantii</i> .....	17
3.5.	Controle da podridão azeda pela associação da levedura <i>Sporobolomyces koalae</i> e do fungicida guazatine .....	18
3.6.	Combinação dos métodos químico, biológico, físico e natural para controle da podridão azeda em frutos cítricos .....	18
3.7.	Avaliação dos ensaios <i>in vivo</i> .....	19
3.8.	Interações <i>in vitro</i> .....	21
3.8.1.	Sobrevivência de <i>Sporobolomyces koalae</i> na presença do fungicida guazatine.....	21
3.8.2.	Produção de compostos termoestáveis produzidos por <i>Sporobolomyces koalae</i> , em meio de cultura acrescido do fungicida guazatine .....	21
3.8.3.	Produção de compostos antifúngicos livres de células de <i>Sporobolomyces koalae</i> , em meio de cultura acrescido do fungicida guazatine .....	22
3.9.	Avaliação <i>in vivo</i> da densidade populacional de <i>Sporobolomyces koalae</i> , após tratamento dos frutos com a levedura associada ou não ao fungicida guazatine (1%) .....	23



3.10. Efeito da aplicação de diferentes métodos de controle da podridão azeda nos parâmetros de qualidade de frutos cítricos .....	24
3.10.1. Determinação do rendimento do suco.....	25
3.10.2. Teor de Sólidos Solúveis Totais - °Brix .....	25
3.10.3. Acidez total titulável (ATT).....	26
3.10.4. “Ratio” .....	27
3.10.5. Análises estatísticas.....	27
4. RESULTADOS .....	28
4.1. Utilização de diferentes doses de guazatine no desenvolvimento micelial de <i>Geotrichum citri-aurantii</i> .....	28
4.2. Controle da podridão azeda pela associação da levedura <i>Sporobolomyces koalae</i> e do fungicida guazatine .....	28
4.3. Combinação dos métodos químico, biológico, físico e natural para controle da podridão azeda em frutos cítricos .....	30
4.4. Interações <i>in vitro</i> .....	34
4.4.1. Sobrevivência de <i>Sporobolomyces koalae</i> na presença do fungicida guazatine.....	34
4.4.2. Produção de compostos termoestáveis produzidos por <i>Sporobolomyces koalae</i> , em meio de cultura acrescido do fungicida guazatine .....	35
4.4.2. Produção de compostos antifúngicos livres de células de <i>Sporobolomyces koalae</i> , em meio de cultura acrescido do fungicida guazatine .....	36
4.5. Avaliação <i>in vivo</i> da densidade populacional de <i>Sporobolomyces koalae</i> , após tratamento dos frutos com a levedura associada, ou não, ao fungicida guazatine (1%) .....	37
4.6. Efeito da aplicação de diferentes métodos de controle da podridão azeda nos parâmetros de qualidade de frutos cítricos .....	39
4.6.1. Rendimento de suco.....	39
4.6.2. Teor de sólidos solúveis totais - °Brix.....	40
4.6.3. Acidez total titulável (ATT).....	41
4.6.4. “Ratio” .....	43
5. DISCUSSÃO.....	45
6. CONCLUSÕES.....	50
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	51

## ÍNDICE DE TABELAS

	Pag.
<b>Tabela 1.</b> Valores de referência da porcentagem de suco dos cultivares	25
<b>Tabela 2.</b> Valores de referência de sólido solúveis totais (°BRIX) suco dos cultivares.	26
<b>Tabela 3.</b> Valores de referência da porcentagem de acidez titulável dos cultivares.	26
<b>Tabela 4.</b> Valores correspondentes à soma de quadrado, quadrado médio, significância e coeficiente de variação do efeito de diferentes tratamentos em frutos de laranja Pêra armazenados a 10°C, em relação à porcentagem de rendimento de suco.	39
<b>Tabela 5.</b> Influência de diferentes tratamentos na porcentagem do rendimento de suco de laranja Pêra armazenada a 10°C.	40
<b>Tabela 6.</b> Influência do tempo de armazenamento (em dias) a 10°C, em frutos de laranja Pêra com diferentes tratamentos, na porcentagem de rendimento de suco de laranja Pêra.	40
<b>Tabela 7.</b> Valores correspondentes à soma de quadrado, quadrado médio, significância e coeficiente de variação do efeito da aplicação de diferentes tratamentos em frutos de laranja Pêra armazenados a 10°C, em relação aos valores de sólidos solúveis (°Brix).	41
<b>Tabela 8.</b> Valores médios do teor de sólidos solúveis totais (°Brix) de laranja Pêra armazenado a 10°C em função de diferentes tratamentos.	41
<b>Tabela 9.</b> Valores correspondentes à soma de quadrado, quadrado médio, significância e coeficiente de variação do efeito da aplicação de diferentes tratamentos em frutos de laranja Pêra armazenados a 10°C, em relação acidez titulável (g de ácido cítrico/100 mL de amostra).	42
<b>Tabela 10.</b> Influência de diferentes tratamentos nos valores de acidez titulável (g de ácido cítrico/100 mL de amostra) em laranja Pêra armazenada a 10°C.	42
<b>Tabela 11.</b> Influência do tempo de armazenamento (em dias) a 10°C, em frutos de laranja Pêra com diferentes tratamentos nos valores de acidez titulável (g de ácido cítrico/100 mL de amostra).	43

**Tabela 12.** Valores correspondentes à soma de quadrado, quadrado médio, significância e coeficiente de variação do efeito de diferentes tratamentos em frutos de laranja Pêra armazenados a 10°C, em relação aos valores médios de “ratio” (sólidos solúveis/ acidez titulável). 43

**Tabela 13.** Influência do tempo de armazenamento (em dias) a 10°C, em frutos de laranja Pêra com diferentes tratamentos, nos valores médios de “ratio” (sólidos solúveis/acidez titulável). 44

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pag.
<b>Figura 1.</b> Cinturão Citrícola	5
<b>Figura 2.</b> Ilustração da avaliação da severidade, por meio da medição diária da lesão de podridão azeda, após os diferentes tratamentos e inoculação com <i>Geotrichum citri-aurantii</i> .	20
<b>Figura 3.</b> Crescimento micelial de <i>Geotrichum citri-aurantii</i> em meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA) acrescido de guazatine. (A) Controle (BDA + 0,1 água); (B) BDA + guazatine a 0,1%.	28
<b>Figura 4.</b> Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para o diâmetro médio (mm) da lesão causada por <i>Geotrichum citri-aurantii</i> , após o tratamento preventivo (A) e curativo (B) com diferentes doses de guazatine associados, ou não, com <i>Sporobolomyces koalae</i> (ACBL-42). Os valores médios marcados com a mesma letra minúscula não são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).	29
<b>Figura 5.</b> Frutos de laranja Pêra após tratamento com guazatine (1%) associado com <i>Sporobolomyces koalae</i> (ACBL-42). Tratamento testemunha (A) e tratamento com guazatine (1%) associado com ACBL-42 (B).	29
<b>Figura 6.</b> Porcentagem de frutos doentes de laranja Pêra após o tratamento preventivo (A) e curativo (B) com diferentes dosagens de guazatine associadas, ou não, com <i>Sporobolomyces koalae</i> (ACBL-42). Os valores médios marcados com a mesma letra minúscula não são significativamente diferentes, de acordo com o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).	30

**Figura 7.** Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para o diâmetro médio (mm) da lesão causada por *Geotrichum citri-aurantii*, após o tratamento preventivo (A) e curativo (B) com diferentes métodos de controle, como termoterapia, biológico, químico e natural, associados ou não, em frutos de laranja Pêra. Os valores médios marcados com a mesma letra minúscula não são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey (P <0,05). 31

**Figura 8.** Porcentagem de frutos de laranja Pêra com sintomas de podridão azeda, após tratamento preventivo (A) e curativo (B) com diferentes métodos de controle para *Geotrichum citri-aurantii*, como termoterapia, biológico, químico e natural, associados ou não. Os valores médios marcados com a mesma letra minúscula não são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey (P <0,05). 32

**Figura 9.** Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para o diâmetro médio (mm) da lesão causada por *Geotrichum citri-aurantii*, após o tratamento preventivo (A) e curativo (B) com diferentes métodos de controle, como termoterapia, biológico, químico e natural, associados ou não, em frutos de tangor Murcott. Os valores médios marcados com a mesma letra minúscula não são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey (P <0,05). 33

**Figura 10.** Porcentagem de frutos de tangor Murcott com sintomas de podridão azeda após tratamento preventivo (A) e curativo (B) com diferentes métodos para o controle de *Geotrichum citri-aurantii*. Os valores médios marcados com a mesma letra minúscula não são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey (P <0,05). 33

**Figura 11.** Frutos doentes de tangor Murcott após tratamento com guazatine (1%) associadas com *Sporobolomyces koalae* (ACBL-42). Tratamento testemunha (A) e tratamento com guazatine (1%) associado a ACBL-42 (B). 34

- Figura 12.** Sobrevivência de *Sporobolomyces koalae* ACBL-42 em meio YEPD (A), em meio YEPD + fungicida guazatine (1%) (B) e, em meio YEPD + fungicida guazatine (2%). 35
- Figura 13.** Avaliação de produção de compostos termoestáveis produzidos por *Sporobolomyces koalae* mediante a presença do fungicida guazatine em diferentes dosagens. Testemunha – YEPD + levedura (A), YEPD + guazatine a 1% (B) e YEPD + guazatine a 2% (C). 36
- Figura 14.** Avaliação de produção de compostos livres de células de *Sporobolomyces koalae* mediante a presença do fungicida guazatine em diferentes dosagens. Testemunha (A), YEPD com guazatine a 1% (B) e YEPD com guazatine a 2% (C). 37
- Figura 15.** Densidade populacional de *Sporobolomyces koalae* ACBL-42, aplicadas em fermentos de frutos cítricos armazenados a 25°C (A) ou 10°C (B). Cada ponto ou coluna representa a média de cinco repetições. 38

# CONTROLE DA PODRIDÃO AZEDA EM FRUTOS CÍTRICOS ATRAVÉS DE MÉTODOS ALTERNATIVOS

**Autor: BIANCA IKARI MACHADO**

**Orientador: Profa. Dra. KATIA CRISTINA KUPPER**

## RESUMO

Fungicidas como o Tiabendazol e Imazalil são comumente utilizados para o controle de doenças de pós-colheita em citros, apresentando um bom controle, especialmente, sobre o bolor azul (*Penicillium italicum*) e o bolor verde (*Penicillium digitatum*). Por outro lado, para a podridão azeda causada por *Geotrichum citri-aurantii* que ocorre, também, na pós-colheita não existe nenhum método sustentável ou, um produto químico com capacidade de controle que seja registrado nas condições do Brasil. A restrição ao uso de produtos químicos, devido à fitotoxicidade, efeitos residuais, espectro de ação, obtenção de linhagens resistentes pelo patógeno e seus efeitos nocivos têm estimulado a redução de seu uso e a adoção de métodos alternativos e menos agressivos. Práticas específicas, como o controle biológico ou, o uso de produto natural, visam manter o equilíbrio do agroecossistema, de modo que, a planta na presença do patógeno não sofra danos econômicos significativos. Diante do exposto o objetivo deste trabalho foi investigar diferentes métodos alternativos para o controle da podridão azeda. Para tal, foram realizados testes *in vitro* e *in vivo* com frutos de laranja Pêra e tangor Murcott, onde os mesmos foram submetidos aos tratamentos com imersão (termoterapia, quitosana e fungicida guazatine nas diferentes doses) ou, de pipetagem (suspensão da levedura *Sporobolomyces koalae*), associados ou não. Os testes *in vitro* mostraram o potencial do fungicida guazatine para controle de *G. citri-aurantii*, proporcionando 100% de inibição no seu crescimento micelial. A utilização de metade da dose do fungicida associado com a levedura *S. koalae* (ACBL-42) foi o melhor controle para a podridão azeda em frutos de laranja Pêra e tangor Murcott, com 100% de frutos sadios e, não afetou a qualidade dos mesmos. A quitosana, utilizada como produto natural, só foi eficiente na diminuição do tamanho das lesões causadas por *G. citri-aurantii*, não diminuindo a quantidade de frutos doentes e, esse

efeito só foi observado quando os frutos de laranja Pêra e de tangor Murcott foram tratados de forma curativa. O tratamento preventivo da levedura sozinha se mostrou eficiente para o controle da doença em tangor Murcott. O tratamento térmico (52°C por três minutos) combinado, ou não, com o método biológico (levedura) ou, produto natural (quitosana 2% por três minutos) não apresentou controle efetivo da doença, quando aplicado em frutos cítricos.

**Palavras chave:** *Citrus* spp.; *Sporobolomyces koalae*; termoterapia; quitosana.



# **SOUR ROT CONTROL IN CITRUS FRUITS BY THE ALTERNATIVE METHODS**

**Author: BIANCA IKARI MACHADO**

**Adviser: Profa. Dra. KATIA CRISTINA KUPPER**

## **ABSTRACT**

Fungicides such as Thiabendazole and Imazalil are commonly used for the control of post-harvest diseases in citrus, presenting a good control especially on blue mold (*Penicillium italicum*) and green mold (*Penicillium digitatum*). On the other hand, for the sour rot caused by the *Geotrichum citri-aurantii* that occurs, also, in the post-harvest of citrus there is no sustainable method or, a chemical control that is registered under the conditions of Brazil. The restriction of the use of chemical products due to phytotoxicity, residual effects, action spectrum, obtaining of resistant strains from pathogen and its harmful effects have stimulated the reduction of its use and the adoption of alternative methods. Specific practices, such as biological control or the use of natural products, aim at maintaining the equilibrium of the agroecosystem, so that the plant in the presence of the pathogen does not suffer significant economic damages. In view of the above, the objective of this work was to investigate different alternative methods for the control of sour rot. For this, *in vitro* and *in vivo* tests were carried out with fruits of Pêra sweet orange and Murcott tangor, where they were submitted to treatments with immersion (heat treatment, chitosan and guazatine fungicide at different doses) or pipetting (suspension of yeast *Sporobolomyces koalae*), associated or not. *In vitro* tests showed the potential of the guazatine fungicide to control *G. citri-aurantii*, providing 100% inhibition in the mycelial growth. The use of half of dose of the fungicide associated with *S. koalae* yeast (ACBL-42) was the best control for sour rot in Pêra sweet orange and Murcott tangor fruits, with 100% healthy fruits and did not affect the quality of the fruits. Chitosan, as a natural product, was only effective in the reducing of size of the lesions caused by *G. citri-aurantii*, and did not decrease the number of diseased fruits, and this effect was only observed when the fruits of Pêra sweet orange and Murcott tangor were treated in a curative way. The prevent treatment with yeast alone showed efficient control of disease in tangor Murcott. The heat treatment (52°C/three minutes) combined or not with biological method (yeast) or natural

product (chitosan) did not present effective control of the disease, when applied in citrus fruits.

Keywords: *Citrus* spp.; *Sporobolomyces koalae*; heat treatment; chitosan.

# 1. INTRODUÇÃO

A cultura dos citros representa um importante segmento agroindustrial para a economia brasileira. O Brasil detém mais de 50% da produção mundial de suco de laranja, exportando 98% do volume produzido e atingindo 85% da participação no mercado mundial, o que arrecada aproximadamente 189 milhões em impostos para o Estado brasileiro (FUNDECITRUS, 2017).

Nos últimos anos o setor citrícola vem sofrendo momentos de transformação, visando aumentar a competitividade no mercado externo e interno, através da redução de custos e, dentro desse contexto, os tratamentos fitossanitários podem representar até 30% dos custos de produção da laranja. As doenças de pós-colheita se destacam por causar perdas econômicas significativas, sendo os fungos os responsáveis pela perda de quantidade e qualidade dos frutos (LIU et al., 2017).

Dentre os fitopatógenos que ocorrem na pós-colheita, encontra-se o fungo *Geotrichum citri-aurantii*, agente causal da podridão azeda em frutos cítricos, doença que acomete todas as variedades de citros em todas as regiões produtoras do mundo (OLIVEIRA et al., 2016).

A podridão azeda não é controlada pelos produtos químicos imazalil e tiabendazol, que comumente são utilizados em *packing-houses* para o controle de bolores. Por outro lado, o produto guazatine tem registro para o controle dessa doença em diversos países da Europa (McKAY et al., 2012), da África do Sul (KELLERMAN et al., 2018) e Austrália (ISMAIL, 2004), porém, não é registrado no Brasil (European Food Safety Authority, 2014).

No entanto, o uso de produtos químicos se torna cada vez mais restrito por diversos fatores como: a ocorrência de fitotoxicidade, resíduos nos frutos e obtenção de linhagens resistentes pelo patógeno, devido ao uso excessivo e frequente do mesmo produto para o controle de doenças de pós-colheita. Considerando o aumento da demanda dos consumidores por produtos mais sustentáveis, a procura por métodos alternativos de controle, como uso de bioprodutos, óleos essenciais e produtos naturais, se faz necessário (CARRÉ et al., 2002; FELIZIANI & ROMANAZZI, 2013).

Diversos autores apresentam resultados promissores para o controle biológico de fitopatógenos que acometem os citros (KUPPER et al., 2012; LOPES et

al., 2015; KLEIN et al., 2016; FUJIMOTO & KUPPER, 2016) e, em particular, para controle de fungos de pós-colheita por meio de leveduras (FERRAZ et al., 2016) associadas ou não, com fungicida (LIMA et al., 2013; MORETTO et al., 2014).

Os métodos físicos podem atuar direta ou, indiretamente, sobre os patógenos, atuando sobre a fisiologia do fruto, podendo retardar seu amadurecimento, e manter certa resistência a patógenos (BENATO, 1999). Tratamentos térmicos realizados antes do armazenamento dos frutos são uma alternativa aos fungicidas e têm demonstrado resultados eficientes no controle de doenças de pós-colheita, podendo agir na inibição do desenvolvimento do patógeno ou, pela ativação dos mecanismos de defesa dos frutos (NAFUSSI et al., 2001; SMILANICK et al., 2003; FORNER et al., 2013). Muitas vezes, a aplicação do tratamento térmico apresenta resultado mais eficiente, quando combinada com um microrganismo antagonista, em estratégias simultâneas ou sucessivas (CONWAY et al., 2004).

Entre outras medidas alternativas de manejo de doenças de pós-colheita, a utilização de produtos naturais, como a quitosana tem demonstrado eficiência para o controle de patógenos (SENHOR et al., 2009). Acredita-se no potencial do polímero quitosana como uma substância alternativa ao controle de bolores e podridões de pós-colheita em citros, devido a sua capacidade antimicrobiana contra diversos microrganismos, uma vez que o polímero é capaz de formar sobre a fruta tratada um filme pouco permeável ao oxigênio, podendo, também, agir como uma espécie de indutor de resistência da fruta tratada (ROMANAZZI et al., 2015).

Diante do exposto o objetivo deste trabalho foi investigar diferentes tratamentos alternativos para o controle da podridão azeda, utilizando a levedura *Sporobolomyces koalae*, a termoterapia, quitosana e o fungicida guazatine, associados, ou não, entre si.

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 Agroecologia e Desenvolvimento Rural**

Com a prática da agricultura, o homem ao cultivar a terra acabou por desenvolver pesquisas científicas e avanços tecnológicos no intento de obter ganhos de produtividade, sem muita preocupação com a esgotabilidade dos recursos naturais. Quando se percebeu que o molde implementado causava prejuízos elevados ao meio ambiente, alguns até mesmo irreversíveis; passou-se a ter consciência da importância das questões ambientais.

Nas últimas décadas o interesse em promover novos sistemas de produção cresceu, pois estes se apresentam compatíveis com as tendências do desenvolvimento sustentável.

Historicamente o surgimento da agroecologia, que é tida como uma agricultura de base ecológica sucedeu-se na década de 70, em decorrência da necessidade de um suporte teórico para as diferentes correntes de agriculturas alternativas que vinham se desenvolvendo desde os anos 20 (WEZEL et al., 2009). Produzir sob bases agroecológicas nada mais é do que retornar aos modelos primários de produção, dos quais, valores como manejo de produção feito de forma natural e que se adequem aos limites produtivos de cada cultura e do ambiente das propriedades, andam atualmente esquecidos e anulados em nome da modernização do campo. A necessidade de se produzir alimentos de forma saudável é um verdadeiro desafio e incentivo para empregar o uso de práticas agrícolas de base agroecológica, frente aos conflitos e preocupações dos sistemas de produção convencional (ABREU, 2016).

Dessa forma, a agroecologia é uma nova proposta de agricultura, que almeja maximizar o processo de produção de alimentos, ao mesmo tempo em que minimiza a utilização dos insumos externos, manejando os agroecossistemas para que este se pareça o máximo com o ecossistema natural, conseqüentemente preservando a biodiversidade mantendo um processo altamente produtivo, economicamente viável e ambientalmente consistente – sustentável (GLIESSMAN, 2001).

Na agricultura brasileira experiências de produção baseadas nas normas internacionais da agricultura orgânica, demonstram que neste tipo de manejo,

espera-se estimular a atividade microbiana do solo, procurando assim, além de ativar os processos naturais de ciclagem de nutrientes, estabelecer o controle biológico natural de pragas e doenças. No entanto, ainda há poucos estudos avaliando o impacto do manejo incentivado na agricultura orgânica sobre a microbiota do solo (FRANÇA, 2004).

Vero et al. (2002) articulam sobre o esquema de controle integrado, onde pode ser utilizado, de forma excessiva ou conjunta, ao controle biológico e os outros tipos de controle, entre eles, o cultural, o físico, o genético e o químico.

## 2.2. Citricultura

Os citros são classificados botanicamente como pertencentes à família Rutaceae, sendo descritas dezenas de espécies para esta família. As plantas do gênero *Citrus*, *Fortunella*, *Poncirus* e outros gêneros da subfamília Aurantioideae são nativos do sudeste do continente asiático, com filogenética que se alcançam do Centro da Índia ao Japão, e do leste da Índia à Nova Guiné, Austrália e África tropical (SWINGLE, 1943). Os árabes foram os responsáveis pela chegada da laranja na Europa durante a Idade Média, e em meados do século XIV, através das expedições de Cristovão Colombo, foi introduzida no continente americano e no Brasil, logo no início de sua colonização. Sendo um país de clima e condições adequadas para produção, a cultura obteve grande êxito, superando até suas regiões de origem, expandindo-se por todo território brasileiro. Destacando-se em vários estados, a partir da década de 20, a citricultura criou seu primeiro núcleo citrícola (NEVES et al., 2010).

Os citros abrangem um grande grupo de plantas, representado, principalmente, por laranjas (*Citrus sinensis* Osbeck), tangerinas (*C. reticulata* Blanco; *C. deliciosa* Tenore), limões (*C. limon* Burn), limas ácidas como o Tahiti (*C. latifolia* Tan), limas doces, como a lima da Pérsia (*C. limettioides* Tanaka), pomelo (*C. paradisi* Macfad), cidra (*C. medica* Linnaeus) e laranja azeda (*C. -aurantium* Linnaeus) (LOPES et al., 2011).

As plantas cítricas encontram-se melhores adaptadas em climas com temperatura média entre 23 e 32°C e alta umidade relativa do ar. Dessa forma, o

clima do Brasil exerce grande influência sobre sua produtividade interferindo na qualidade e quantidade dos frutos ao longo das regiões produtoras (ORTOLANI et al., 1987), conferindo a citricultura do país, alta competitividade no mercado internacional.

O cultivo da laranja está presente em todos os estados brasileiros, sendo a fruta mais plantada no país, no entanto as mudanças e padrões tecnológicos mais notáveis sucedem no estado de São Paulo e no Triângulo Mineiro, região essa conhecida como cinturão citrícola (Figura 1), de onde saem mais de 80% das laranjas produzidas no país. Apesar de ser uma região contínua, existem diferenças particulares de uma determinada localidade em relação à outra (SOUZA et al., 2013).

Figura 1 – Cinturão citrícola.



Fonte: Citrosuco, 2012

A citricultura brasileira está instalada em aproximadamente uma área de 814 mil hectares, com produção média alta (AGRIANUAL, 2013). O Brasil detém mais de 50% da produção mundial de suco de laranja, exportando 98% do volume produzido e atingindo 85% da participação no mercado mundial, o que arrecada aproximadamente 189 milhões em impostos para o estado brasileiro (FUNDECITRUS, 2017). De acordo com Neves et al. (2010), a cada cinco copos de suco de laranja consumidos no mundo, três são provenientes de pomares brasileiros.

Passando por momentos de oscilação econômica, o Brasil ainda se destaca como maior produtor de laranja do mundo, sendo o estado de São Paulo o maior

exportador de suco de laranja concentrado congelado, atingindo na safra de 2016/2017 uma produção de 245,31 milhões de caixas de 40,8kg. Para a safra da laranja de 2017/2018 estima-se uma produção total de 364,47 milhões de caixas de laranja (FUNDECITRUS, 2017).

As atividades citrícolas são demasiadamente importantes para o país, não apenas por serem representativas na economia brasileira, mas por ser um setor gerador de empregos e renda, formador de capital, agregação de valor e, atuando também, no desenvolvimento regional (NEVES et al., 2010; ZULIAN et al., 2013). Entretanto, com uma mudança considerável nos regimes de chuva aliado à ocorrência do *greening* (Huanglongbing/HLB) e do cancro cítrico, a região Sul do cinturão citrícola tornou-se propícia ao desenvolvimento da cultura, gerando um crescimento exponencial de produção (FUNDECITRUS, 2017).

Assim, o cenário citrícola é de grande relevância para o país, reforçando a necessidade de manutenção da competitividade do setor nos mercados internacionais e a necessidade de agentes que o coordenem (BORGES & COSTA, 2006).

Por ser tão representativa a cultura do citros requer cuidados fitossanitários precisos e investimentos em alta tecnologia no manejo do cultivo (ALMEIDA, 2016). Na classe dos agroquímicos, a citricultura se destaca pelo uso de acaricidas, seguido pelos inseticidas foliares e por fungicidas de aplicação foliar. Essas três classes representam 55% dos gastos com agroquímicos no setor. A maior expressão do HLB e do cancro fez com que o aumento do consumo de inseticidas acontecesse de forma exponencial na citricultura, onde de 2003 até meados de 2010 houve um crescimento de cerca de 600% de consumo desses produtos (NEVES et al., 2010).

O setor também sofre grandes perdas causadas particularmente por fungos patogênicos, que podem afetar até 50% de sua produção, dentre estes, as doenças de pós-colheita se destacam, pois normalmente são iniciadas durante a colheita, podendo se desenvolver no campo, durante o transporte, embalagem e armazenamento (SPADARO & GULLINO, 2004; AGRIOS, 2005).

Devido aos problemas causados ao meio ambiente pela utilização de produtos químicos, a busca por tecnologias tem impulsionado o desenvolvimento de métodos alternativos de controle de doenças de plantas, considerados



ambientalmente mais seguros. Assim, diversas pesquisas vêm avaliando produtos alternativos que reduzem os problemas fitossanitários (BROETTO et.al., 2014).

### **2.3. Doenças de pós-colheita**

Pós-colheita é o período que transcorre a partir do momento que em que os produtos são colhidos no campo, até o seu consumo em estado fresco, preparado ou transformado industrialmente. A pós-colheita de produtos agrícolas se caracteriza por um conjunto de processos integrados e sequenciais, pelos quais passam os produtos depois da colheita, durante algumas etapas onde os mesmos necessitam passar até a chegada aos consumidores, estando diretamente vinculados ao sistema de produção (VERO et al., 2016).

Dentre as doenças de pós-colheita em frutos cítricos, destacam-se os bolores azul e verde, causados por *Penicillium italicum* e *P. digitatum* respectivamente, bem como a podridão azeda, ocasionada por *Geotrichum citri-aurantii*. Estes patógenos diminuem a quantidade e a qualidade dos frutos, prejudicando os valores nutricionais e de mercado. Essas doenças podem ser prevenidas por meio de uma colheita cuidadosa, de forma a minimizar a produção de injúrias nos tecidos dos frutos (FERRAZ, 2014).

Várias medidas podem ser adotadas para a redução das perdas com doenças de pós-colheita, sobressaindo-se as modificações nas práticas de manuseio dos frutos que possam danificar sua superfície, diminuindo os riscos de infecções iniciadas por ferimentos de qualquer natureza (JOHNSON & HEATHER, 1995). Práticas sanitárias que visem eliminar frutos infectados e outras fontes de inóculo existentes nos pomares, veículos, equipamentos, materiais de colheita e transporte são medidas importantes que podem ser adotadas, assim como, a higienização dos locais onde os frutos serão processados e armazenados (CUNHA, 2013).

A forma de disseminação dos patógenos é muito eficiente, podendo os esporos ser levados facilmente pelo ar e água, dentre outros veículos de transporte, tornando-se abundante nos *packing-houses*. Lavagens com desinfetantes, como hipoclorito de sódio, são praticas úteis e usuais para a diminuição da quantidade de inóculos nas câmaras de armazenamento dos frutos. A aplicação de fungicidas

como o Imazalil e Tiabendazol, aplicados na fase de pós-colheita, assim como benzimidazóis que podem ser aplicados nos pomares até três semanas antes da colheita (FISCHER et al., 2004) são medidas usais de controle dessas doenças.

Outra prática sanitária refere-se à associação de produto químico com outros métodos que potencializam a eficiência de controle, destacando-se o uso de refrigeração, termoterapia, radiação e atmosfera controlada e modificada (ZAMBOLIM et al., 2002).

Alguns patógenos apresentam persistência por longos períodos, indicando uma possível seleção de capacidade adaptativa, competitiva e persistência da resistência, ocasionada, possivelmente, pela utilização excessiva e frequente de fungicidas, provocando a ocorrência de linhagens resistentes do patógeno, que normalmente apresentam crescimento mais lento e menor capacidade competitiva, quando comparado às linhagens sensíveis (KINAY et al., 2007). Autores, como Silva et al. (2011) e Arras et al. (2002) relatam que a integração de produtos químicos com biológicos podem reduzir a vasta aplicação desses fungicidas, com riscos reduzidos de desenvolvimento de linhagens de patógenos resistentes.

### **2.3.1. *Geotrichum citri-aurantii***

*Geotrichum citri-aurantii* (Ferraris) Cif. & F. Cif., é um fungo leveduriforme, sendo esta variedade denotada pela sua capacidade em infectar frutas cítricas e crescer em valores de pH baixos. O fungo é endêmico do solo e comumente encontrado na superfície dos frutos. A fase telemórfica do fitopatógeno (*Endomyces geotrichum*) não é comumente observada em solos ou, em frutos cítricos infectados (BUTLER et al., 1988; FENG et al., 2011; McKAY et al., 2012).

A podridão azeda, também conhecida como podridão ácida dos frutos cítricos, está disseminada em todos os países produtores da cultura, afetando todas as cultivares. Embora as perdas causadas pela podridão azeda sejam relativamente menores, quando comparada aos bolores, a doença pode ocorrer com maior impacto dependendo da estação, do ano e da área de cultivo (TALIBI et al., 2012).

O desenvolvimento da podridão azeda está diretamente ligado às condições climáticas e ambientais, sendo condições ideais para o desenvolvimento do

patógeno temperaturas entre 25-30°C e pH ácido, aproximadamente 2,7 (SAVASTANO & FAWCETT, 1929). O habitat natural do fungo é o solo, sendo transportado para a superfície dos frutos conforme seu amadurecimento e condições suscetíveis à infecção, como altos níveis de umidade na casca, como quando os frutos são colhidos no início da manhã posterior à alguma irrigação ou chuvas, favorecendo a germinação e o desenvolvimento de conídios do fungo (TOFFANO, 2005; TALIBI et al., 2012).

O fungo precisa obrigatoriamente de algum ferimento ou lesão para se instalar e infectar o tecido. Os frutos infectados manifestam lesões que se estendem para o albedo, sendo os sintomas iniciais semelhantes aos dos bolores, apresentando uma lesão encharcada de água, com coloração amarelo escura. A cutícula é facilmente deslizada na epiderme formando camadas enrugadas com subsequente cobertura do micélio branco ou creme, sendo que o fungo degrada o fruto completamente em quatro ou cinco dias, tornando-o uma massa viscosa, frequentemente associada ao bolor verde, e até mesmo estimulada por sua presença (SUPRAPTA et al., 1995; BROWN, 2003; TOURNAS, 2005; LIU et al., 2009; PALOU et al., 2009). Esses sintomas se sucedem, pois o fungo *G. citri-aurantii* produz enzimas extracelulares responsáveis pela degradação da casca, causando uma infecção com cheiro desagradável, característico da doença, o qual origina seu nome (REES; FARREL; ORCHARD, 2012).

Fatores como a quantidade de inóculo interferem na incidência e na severidade da doença (BAUDOIN & ECKERT, 1982). A quantidade de esporos encontradas no local de armazenamento dos frutos influencia diretamente o nível de podridão (BROWN, 1975), sendo a água e o solo altas fontes de contaminação. Há uma produção de conídios na água muito alta, e estes se espalham nos tanques e escovas de lavagem, drenchers e outros locais onde os frutos são expostos quando chegam ao *packing-house* (KORSTEN & TAVERNER; 2009). No solo, quando o fruto cai no chão, onde existem populações elevadas do patógeno por seu endemismo, os cuidados na etapa de colheita são essenciais para que esse contato com a fonte de inóculo não aconteça (BROWN, 2003).

Uma das alternativas muito utilizadas para mitigar a infecção é a armazenagem em temperatura refrigerada, porém, se o fruto estiver infectado,

quando transferido para comercialização com temperaturas mais elevadas, facilmente retomará o seu crescimento (REES; FARREL; ORCHARD, 2012).

Dos fungicidas registrados para controle de doenças de pós-colheita, nenhum é capaz de controlar a podridão azeda (LIU et al., 2009; TALIBI, 2012). Alguns países utilizam guazatine e propiconazole para controle de *G. citri-aurantii*, que são fungicidas que conseguem controlar a doença, porém o guazatine não tem registro em muitos países, inclusive no Brasil, o que torna o contexto da doença realmente alarmante (BROWN, 1988; McKAY et al., 2012).

Hao et al. (2010) e Klein et al. (2017) reiteram que a falta de um produto registrado para o controle da podridão azeda se torna um problema sério para a comercialização de frutos cítricos de qualidade, onde a importância do desenvolvimento de estratégias de controle demanda maiores estudos, tornando-se, assim, um desafio para os pesquisadores.

## **2.4. Métodos alternativos de controle**

A adoção de tecnologias alternativas de controle fitossanitário objetiva alcançar alta produtividade das culturas tratadas, mas considerando contudo e principalmente, gerar o mínimo de impacto sobre os ecossistemas, a organização social e cultural das comunidades locais (PAULA JUNIOR et al., 2016).

O controle alternativo pode ser definido como um controle flexível de aplicação multidimensional, que engloba vários métodos de controle como o biológico, físico e cultural, aliado a estratégias de controle químico para a diminuição de doenças (LEWIS & PAPAVIDAS, 1991). Segundo Nuñez et al. (2002), a racionalização do controle químico associado a métodos naturais devem satisfazer as exigências econômicas, ecológicas e toxicológicas.

Há exemplo de controle integrado, onde se utiliza do controle biológico e controle químico em doses menores que as recomendadas. No trabalho de Lima et al. (2013), verificou-se que a aplicação em conjunto de leveduras antagonistas associadas a baixas dosagens de Tiabendazol, foram mais efetivas no controle do bolor-azul em laranja Pêra do que o uso isolado de cada tratamento. Moretto et al. (2014) relataram um controle de 100% do bolor verde, quando frutas de lima ácida

Tahiti foram tratadas com meia dose de imazalil associada com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

### **2.4.1. Controle Biológico**

O controle biológico visa manter, através de práticas específicas, um equilíbrio no agroecossistema, de modo que o hospedeiro, na presença do patógeno, não sofra danos significativos, em função da ação controladora dos organismos não patogênicos do sistema (GRIGOLETTI JR et al., 2000). De acordo com o conceito clássico proposto por Cook & Baker (1983), controle biológico é “a redução da soma de inóculo ou das atividades determinantes da doença provocada por um patógeno, realizada por ou através de um ou mais organismos que não o homem”.

No contexto do controle biológico, doença é o resultado de uma interação entre hospedeiro, patógeno e uma variedade de não patógenos que também habitam o sítio de infecção e que têm potencial para limitar ou aumentar a atividade do patógeno ou, a resistência do hospedeiro, todos influenciados pelo ambiente (COOK, 1985; COOK & BAKER, 1983).

A utilização de Agentes de Controle Biológico (ACB) contra doenças e pragas apresentou um aumento significativo nos últimos anos no Brasil. Tal fato pode ser explicado por alguns fatores, dentre eles, a pressão da sociedade que busca por alimentos mais saudáveis e com menor volume de resíduos nocivos ao ser humano; somados à crescente preocupação com a preservação ambiental. Assim, a eficiência no controle de tais doenças e pragas pelos ACBs produzidos em escala comercial e, a demanda por produtos orgânicos, com certificação de origem comprovada, também contribuiu para uma maior procura pelo controle biológico, bem como, facilitou a sua divulgação (PEDRAZZOLI & HERRMANN, 2016).

Na pós-colheita, o controle biológico é capaz de substituir totalmente ou, atuar em associação com os produtos químicos, restituindo a produção de alimentos de maneira mais sustentável e ecológica. Nos últimos anos o controle biológico das doenças de pós-colheita de frutos se mostrou uma alternativa promissora ao controle químico (ZHIMO et al., 2016). No entanto, deve-se levar em conta que este

tipo de controle é exequível sempre e, quando utilizado no âmbito de um manejo adequado, integrado com outros métodos de controle (VERO et al., 2016).

A eficiência das leveduras como agente de controle biológico contra uma grande variedade de patógenos de doenças de pós-colheita vem sendo demonstrada em diversos estudos nas últimas décadas (IPPOLITO et al., 2000; WISNIEWSKI et al., 1991; VERO et al., 2009; FERRAZ, 2014; KLEIN et al., 2016; ZHIMO et al., 2016; MOURA, 2017).

Elas se destacam entre os microrganismos como agentes potenciais do controle de doenças de plantas e frutos, devido a sua alta capacidade de colonização de superfícies, altas taxas reprodutivas e baixo requerimento nutricional (WISNIEWSKI et al., 1991), o que permite a elas se proliferarem rapidamente.

Por definição, as leveduras são fungos, cujo estado sexual não apresenta corpos de frutificação e seu crescimento vegetativo ocorre por brotamento ou fissão. São microrganismos predominantemente unicelulares, imóveis, sendo a sua maioria saprofítica e alguns casos são parasitas oportunistas (MILLER, 1979; LACHANCE & STARMER, 1998).

As leveduras possuem capacidade de assimilação de uma larga gama de compostos orgânicos, o que torna possível a expansão da sua capacidade de dispersão e sobrevivência (SPADARO & GULLINO, 2004; LIMA et al., 1997; LIMA et al., 1999); produzem polissacarídeos extracelulares que aumentam a sua sobrevivência em diversos ambientes, restringindo, dessa maneira, o espaço para o desenvolvimento do agente fitopatogênico (MENDÉZ & MONDINO, 1999); além de serem tolerantes aos fungicidas frequentemente utilizados na pós-colheita (SPADARO & GULLINO, 2004). Em geral, os mecanismos de ação adotados por esses microrganismos no biocontrole são: competição por espaço e nutrientes, produção de toxina *killer* e hiperparasitismo (COELHO et al., 2011; FERRAZ et al., 2016).

A vantagem de sua utilização no controle de doenças de pós-colheita se deve ao fato destes organismos serem componente da comunidade microbiana da superfície de folhas, frutos e vegetais (WILSON et al., 1993); sendo assim agentes de biocontrole potencialmente mais efetivos, pois já são fenotipicamente mais adaptadas a esses nichos (FILONOW, 1998). Outra grande vantagem da utilização de leveduras no biocontrole de doenças de plantas é uma melhor aceitação por

parte dos consumidores, por serem microrganismos amplamente utilizados na produção de alimentos e bebidas, como iogurtes, pães e vinhos (FERRAZ, 2014).

### **2.4.2. Termoterapia**

Dentre as medidas de controle físico aplicáveis em tecnologias de pós-colheita, o uso do calor e de radiações não ionizantes (Ultravioleta – UV), ventilação e luz tem mostrando-se eficientes na redução de inóculo e desenvolvimento das doenças (GHINI & BETTIOL, 1995).

Os métodos físicos podem atuar direta ou indiretamente sobre os patógenos, atuando sobre a fisiologia do fruto, podendo retardar seu amadurecimento, e manter certa resistência (BENATO, 1999), bem como a alterar a própria atividade celular dos patógenos através das altas temperaturas, pois a maioria dos microrganismos fitopatogênicos apresenta ponto térmico letal na faixa de 45-60°C (DE BRITO et al., 2008).

Os tratamentos com temperaturas elevadas têm demonstrado resultados eficientes no controle de doenças de pós-colheita. Os métodos utilizados são o tratamento com vapor e tratamento com água quente, sendo que os tratamentos com vapor consistem em manter os produtos após a colheita em ambientes com ar quente durante um período, variando o tempo de exposição de acordo com a cultura; já os tratamentos com água quente se dão por imersão ou aspersão de água sob o produto durante períodos curtos a temperaturas em torno de 55°C (BENATO et al., 2001; JUNQUEIRA, 2002; GOLAN & PHILLIPS, 1991).

Embora demonstre boa eficiência no controle de podridões de diversas frutas, a termoterapia apresenta a desvantagem de não ter efeito residual, por vezes requerendo a combinação com outros métodos de controle, no caso dos produtos que demandam maior período de armazenamento (SENHOR et al., 2009). O tratamento térmico realizado antes do armazenamento é uma alternativa aos fungicidas, tanto na inibição do crescimento do patógeno, como na ativação dos mecanismos de resistência do fruto, pois pode induzir a síntese de compostos antifúngicos como as fitoalexinas ou, proteínas relacionadas à patogênese (NAFUSSI et al., 2001; SMILANICK et al., 2003; PALOU et al., 2008; FORNER et al., 2013).

A aplicação de tratamentos térmicos apresenta resultados eficientes quando combinadas com microrganismos biocontroladores em estratégias simultâneas ou sucessivas (CONWAY et al., 2004; LEVERENTZ et al., 2000).

### **2.4.3. Quitosana**

Entre as medidas alternativas de manejo de doenças de pós-colheita também aplica-se a utilização de produtos naturais, podendo ser extraídos a partir de plantas com propriedades antibióticas, crustáceos ou animais, demonstrando eficiente controle dos patógenos (SENHOR et al., 2009). A utilização de tratamentos com quitosana, nos estágios pré-colheita ou pós-colheita, foi considerado como um tratamento alternativo adequado para substituir o uso de fungicidas sintéticos (ROMANAZZI et al., 2015).

A quitosana é um polissacarídeo que deriva da desacetilação da quitina, que segundo o método de obtenção, pode apresentar vários graus de desacetilação. É constituinte da maior parte dos exoesqueletos de insetos, crustáceos e parede celular dos fungos (AZEVEDO et al., 2007), sendo então considerada um produto natural de baixo custo, renovável e biodegradável.

As carapaças de crustáceos são rejeitos da indústria pesqueira, que os consideram em muitos casos como poluentes, estes se apresentam de forma abundante (MIRANI et al., 2014). Dessa forma, a quitosana tem sido utilizada como um material com atraição potencial para diversos usos como na área alimentícia, biotecnologias, ciências dos materiais, tratamentos de águas, produtos farmacêuticos, agricultura e proteção ambiental (AZEVEDO et al., 2007).

Sua utilização na agricultura vem ganhando importância por sua atividade antimicrobiana sobre uma grande variedade de fitopatógenos, entre eles, fungos e bactérias (OLIVEIRA JUNIOR et al., 2012; BRITTO & ASSIS, 2012; NEGREIROS et al., 2013; PEÑA et al., 2014; FREDDO et al., 2014).

Acredita-se no potencial do polímero quitosana como uma substância alternativa ao controle de bolores e podridões de pós-colheita em citros, devido a sua capacidade antimicrobiana e antifúngica contra diversos microrganismos, sendo capaz de formar sobre a fruta tratada um filme capaz de reduzir as trocas gasosas,



podendo também agir como uma espécie de indutor de resistência da fruta tratada (ROMANAZZI et al., 2015).

Existem muitos trabalhos a respeito desse produto, em diversas áreas, alguns deles combinam o uso da quitosana com microrganismos antagonistas para biocontrole de doenças de pós-colheita, como o uso combinado de glicolquitosano a 0,2% juntamente com a levedura *Candida saitoana*, que demonstrou alto nível de proteção em citros e maçã contra *Penicillium digitatum* e *P. expansum* respectivamente, o controle alcançado foi significativamente maior que o obtido para cada tratamento separadamente (EL GHAOUTH et al., 2000).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Frutos

As cultivares utilizadas nesse estudo foram tangor Murcott, um híbrido entre tangerina (*C. reticulata* Blanco) e laranja doce (*C. sinensis* [L.] Osb), e frutos de laranja Pêra (*C. sinensis* (L.) Osbeck), que foram coletados e levados ao laboratório após a colheita, sem quaisquer tratamentos químicos de armazenamento em *packing house*. Eles foram escolhidos para o experimento por sua uniformidade, tamanho, cor e forma, e por estarem livres de patógenos. Os frutos de laranja Pêra foram obtidos em um *packing house* na cidade de Limeira-SP e os frutos de tangor Murcott em um pomar na cidade de Porto Feliz-SP.

#### 3.2. Microrganismos

Para a realização dos testes foram utilizados um isolado de *Geotrichum citri-aurantii* e um isolado de levedura *Sporobolomyces koalae* ACBL-42, pertencentes à coleção de microrganismos do Laboratório de Fitopatologia e Controle Biológico do Centro de Citricultura “Sylvio Moreira”/Instituto Agronômico de Campinas, Cordeirópolis-São Paulo, Brasil.

Para a produção de inóculo, o isolado da levedura foi cultivado em meio YEPD e mantido em estufa para B.O.D. a 25°C com fotoperíodo 12h/12h por 48 horas de cultivo. As colônias de *G. citri-aurantii* foram cultivadas em meio BDA e mantidas em estufa para B.O.D. a 25°C com fotoperíodo 12h/12h por sete dias. As suspensões de levedura e do fungo foram diluídas em água destilada autoclavada, obtendo-se uma concentração final de  $1 \times 10^7$  células/mL e  $1 \times 10^4$  conídios/mL da levedura e do fungo, respectivamente, ajustadas com auxílio de uma câmara de Neubauer.

### **3.3. Quitosana**

Foi utilizado quitosana com baixo peso molecular e grau de desacetilação de 75-85% (Sigma-Aldrich Co). A solução de quitosana a 2% foi preparada de acordo com a metodologia adaptada de Chien et al. (2007), onde foram adicionados 2,0 g do produto a 900 mL de água destilada autoclavada. Para a diluição da quitosana em água foi adicionado 50 mL de ácido acético glacial.

A dose de quitosana a 2% foi determinada em função de resultados obtidos em ensaios preliminares no Laboratório de Fitopatologia e Controle Biológico do Centro de Citricultura “Sylvio Moreira”/IAC, que se mostrou eficiente no controle de outras doenças de pós-colheita de citros (dados não publicados).

### **3.4. Utilização de diferentes doses de guazatine no desenvolvimento micelial de *Geotrichum citri-aurantii***

Esse ensaio teve por objetivo avaliar o efeito do fungicida guazatine no desenvolvimento micelial de *G. citri-aurantii*. Para tal, diferentes doses (0,05%; 0,1%; 0,2%; 0,4%; 0,8%) do fungicida foram acrescentadas em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) fundente de acordo com o tratamento. Em seguida, os meios foram vertidos para placas de Petri e, após a solidificação, discos (5 mm) de *G. citri-aurantii* (sete dias de idade) foram transferidos ao centro das placas. As testemunhas foram representadas pelo cultivo do patógeno em meio BDA, cuja dosagem do produto químico foi substituída por água destilada autoclavada. As culturas foram incubadas em estufa para B.O.D., a 25°C e fotoperíodo 12h/12h.

A avaliação foi realizada quando a colônia do patógeno nos tratamentos testemunha atingiu a borda das placas, por meio de medição do crescimento micelial das colônias de *G. citri-aurantii*, em dois sentidos perpendiculares. Utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições, sendo cada placa considerada uma parcela experimental. O ensaio foi realizado em duplicata.

### **3.5. Controle da podridão azeda pela associação da levedura *Sporobolomyces koalae* e do fungicida guazatine**

Frutos de laranja Pêra (*C. sinensis* (L.) Osbeck) foram coletados, levados ao laboratório e higienizados com detergente neutro e, desinfestados superficialmente com hipoclorito de sódio a 0,1%, por três minutos. Após secagem, foram feridos em dois pontos equidistantes, na região equatorial dos frutos, com agulhas demarcadas a uma profundidade de 3 mm. Em seguida, os frutos foram inoculados com 20 µL de uma suspensão de *G. citri-aurantii* ( $1 \times 10^4$  conídios/mL) (FRANCO & BETTIOL 2002, modificado).

Os tratamentos compreenderam frutos tratados com diferentes doses do fungicida guazatine (0,25%; 0,50%; 1,0%; 1,5%; 2,0%), associadas ou não à levedura ACBL-42 ( $1 \times 10^7$  células/mL); com a levedura sozinha na mesma concentração e frutos tratados com água.

Os frutos foram imersos nos tratamentos com o fungicida por três minutos.

Nos tratamentos que corresponderam à associação com a levedura, os frutos após serem imersos na solução com o produto químico foram tratados no local do ferimento, depositando-se uma alíquota de 20 µL da suspensão da levedura ( $1 \times 10^7$  células/mL).

A aplicação dos tratamentos foi realizada 24 horas antes (tratamento preventivo) e 24 horas após (tratamento curativo) a inoculação do patógeno. O controle correspondeu aos frutos tratados apenas com água destilada e autoclavada no lugar dos tratamentos.

### **3.6. Combinação dos métodos químico, biológico, físico e natural para controle da podridão azeda em frutos cítricos**

Para esse ensaio foram utilizados frutos de tangor Murcott e de laranja Pêra e teve por objetivo verificar a eficiência da combinação dos métodos químico, biológico, físico e natural para controle da podridão azeda. Os tratamentos utilizados foram: (i) fungicida guazatine (2%); (ii) levedura ACBL-42; (iii) termoterapia (52°C); (iv) quitosana (2%); (v) fungicida guazatine (1%) + ACBL-42; (vi) termoterapia +

quitosana; (vii) termoterapia + ACBL-42; (viii) quitosana (2%) + ACBL-42; (ix) termoterapia + quitosana + ACBL-42 e, finalmente, (x) água.

Alíquotas de 20 µL da suspensão da levedura ( $1 \times 10^7$  células/mL) com idade de 48 horas foram aplicadas com auxílio de uma pipeta automática sobre ferimentos, de maneira preventiva e curativa, como descrito no item anterior.

No tratamento com termoterapia os frutos foram imersos em um recipiente contendo água a 52°C por três minutos e, imediatamente, transferidos para água a temperatura ambiente por mais três minutos, de acordo com a metodologia de Nascimento e Santos (2013).

Para o tratamento com quitosana a 2%, os frutos ficaram imersos nessa solução por três minutos. No tratamento combinando termoterapia e quitosana, os frutos ficaram imersos em água 52°C por 3 minutos e depois fez-se o tratamento com quitosana a 2%. Quando se combinou os três métodos, seguiu-se a seguinte ordem de tratamento, frutos submetidos ao tratamento térmico, seguido de inoculação da levedura (20 µL de suspensão contendo  $1 \times 10^7$  células/mL) no local do ferimento e, finalmente, tratados com quitosana a 2%.

No tratamento de associação do fungicida com a levedura, os frutos foram previamente imersos na solução com o fungicida (1%) e, posteriormente, 20 µL da suspensão da levedura ACBL-42 foram depositadas no local do ferimento, como descrito no ensaio anterior.

Os tratamentos, referentes ao controle negativo e positivo, foram representados pelos frutos imersos em água/3 min. e frutos imersos na solução de guazatine (2%)/3 min, respectivamente.

A aplicação dos tratamentos foi realizada 24 horas antes (tratamento preventivo) e 24 horas após (tratamento curativo) a inoculação do patógeno ( $1 \times 10^4$  conídios/mL).

### **3.7. Avaliação dos ensaios *in vivo***

Avaliou-se a incidência da doença, pela porcentagem de frutos doentes, a severidade, por meio da medição diária do diâmetro médio das lesões, com o auxílio de um paquímetro (Figura 2), efetuando-se o cálculo da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), que é expressa pela plotagem da proporção de

doença em porcentagem, versus o tempo (BERGAMIN FILHO & AMORIM, 1996). De acordo com Shaner & Finney (1977), a AACPD pode ser calculada pela fórmula:

$$\text{AACPD} = \sum^{n-1} [(Y_{i+1} + Y_i)/2 * (T_{i+1} - T_i)]; \text{ onde:}$$

**n** – é o número de observações/avaliações;

**Y<sub>i</sub>** – proporção da doença na “i”-ésima observação/avaliação;

**T<sub>i</sub>** – é o tempo em dias na “i”-ésima observação/avaliação.

Para os ensaios *in vivo* foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado com três repetições, sendo 20 frutos por repetição. Os frutos foram armazenados em caixas de propileno com tampa (A x L x C =14 x 30 x 36,5 cm), armazenados a 25 ± 3°C. Os ensaios foram realizados em duplicata.



**Figura 2.** Ilustração da avaliação da severidade, por meio da medição diária da lesão de podridão azeda, após os diferentes tratamentos e inoculação com *Geotrichum citri-aurantii*.

### **3.8. Interações *in vitro***

#### **3.8.1. Sobrevivência de *Sporobolomyces koalae* na presença do fungicida guazatine**

O objetivo desse experimento foi avaliar a interação da levedura *S. koalae* com o fungicida guazatine *in vitro*, medindo sua capacidade de sobrevivência em diferentes doses do fungicida (dose cheia e meia dose).

Para tal, foram preparados em frascos erlenmeyers (250 mL) 100 mL de meio de YEPD líquido acrescidos de 1% (meia dose) ou 2% (dose cheia) do fungicida guazatine. As testemunhas foram representadas por meio YEPD sem o acréscimo do fungicida.

Foi acrescentada uma alíquota (1 mL) da levedura ACBL-42 ( $1 \times 10^5$  células/mL) nos meios de YEPD líquido acrescidos do fungicida ou não, e após 48 horas de crescimento, diluições seriadas foram realizadas ( $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ ). Alíquotas de 100  $\mu$ L de cada diluição foram plaqueadas em meio YEPD ágar contido em placas de Petri, utilizando-se cinco placas para cada diluição. As culturas foram incubadas em estufa para B.O.D. a 25°C por 72 horas e a avaliação foi realizada através da contagem de unidades formadoras de colônias em meio de cultura.

#### **3.8.2. Produção de compostos termoestáveis produzidos por *Sporobolomyces koalae*, em meio de cultura acrescido do fungicida guazatine**

A avaliação da termoestabilidade de compostos antifúngicos produzidos pelo isolado ACBL-42, em meio YEPD acrescido com fungicida guazatine, seguiu a metodologia descrita por Frighetto e Melo (1995).

Alíquotas (1 mL) de suspensão de levedura ( $1 \times 10^5$  células/mL) com 48 horas de cultivo foram transferidas para frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL de meio YEPD líquido acrescidos com fungicida guazatine nas dosagens de 1% ou

2%. Posteriormente, as culturas foram incubadas em shaker sob agitação constante de 150 rpm, em diferentes tempos de incubação, 72, 96 e 120 horas. Transcorrido esses períodos uma alíquota de 10 mL da cultura foi transferida para outros frascos Erlenmeyer (250 mL) contendo 90 mL de meio YEPD. Os meios foram autoclavados (120°C e 1atm de pressão por 20 minutos) e vertidos para placas de Petri. Após a solidificação, discos de 5 mm de diâmetro, obtidos de colônias ativas de *G. citri-aurantii* (sete dias de idade), foram transferidos para o centro das placas de Petri contendo os meios (YEPD + fungicida) e o possível metabólito produzido pela levedura. As testemunhas foram representadas pelo cultivo da levedura em meio YEPD sem fungicida + metabólito da levedura. A incubação das culturas se deu em estufa para B.O.D. a 25°C e fotoperíodo de 12h/12h. A avaliação foi realizada através da medição dos diâmetros da colônia do fungo, em dois sentidos perpendiculares, quando a colônia do patógeno nos tratamentos testemunha atingiu a borda das placas.

### **3.8.3. Produção de compostos antifúngicos livres de células de *Sporobolomyces koalae*, em meio de cultura acrescido do fungicida guazatine**

Foi avaliado os efeitos dos extratos livres de células de ACBL-42, associado com duas dosagens do fungicida guazatine, sobre o crescimento micelial de *G. citri-aurantii*.

Dessa forma, uma alíquota ( $1 \times 10^5$  células/mL) da levedura ACBL-42 com crescimento de 48 horas foi transferida para frascos erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL de meio YEPD líquido acrescidos com fungicida guazatine nas dosagens de 1% ou 2%, em seguida, as culturas foram incubadas em shaker sob agitação constante de 150 rpm, nos intervalos de 72, 96 e 120 horas.

Do meio crescido foi obtida uma alíquota de 10 mL que foi retirada de cada frasco, e em seguida, submetido à filtração em membrana filtrante (0,45  $\mu$ m), a fim de se conseguir um filtrado livre de células de ACBL-42 cultivada em meio com o fungicida (FRIGHETTO & MELO, 1995). As amostras de 10 mL de cada filtrado foram transferidas para erlenmeyers com capacidade para 250 mL, contendo 90 mL



de meio YEPD fundente (aproximadamente 70°C). Posteriormente, os meios foram vertidos para placas de Petri. Depois de solidificado o meio, um disco de 5 mm do fitopatógeno foi transferido para o centro da placa, como descrito no ensaio anterior. As testemunhas foram representadas pelo cultivo da levedura em meio YEPD sem fungicida + metabólito da levedura.

A incubação das culturas e a avaliação foram realizadas de acordo o descrito no ensaio anterior (item 3.8.2.) se deu em estufa para B.O.D. a 25°C e fotoperíodo de 12h/12h. A avaliação foi realizada através da medição dos diâmetros da colônia do fungo, em dois sentidos perpendiculares, quando a colônia do patógeno nos tratamentos testemunha atingiu a borda das placas.

Para os três ensaios de interações *in vitro* utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

### **3.9. Avaliação *in vivo* da densidade populacional de *Sporobolomyces koalae*, após tratamento dos frutos com a levedura associada ou não ao fungicida guazatine (1%)**

Frutos de laranja Pêra (*C. sinensis* (L.) Osbeck) foram higienizados com detergente neutro e, desinfestados superficialmente com hipoclorito de sódio a 0,1%, por três minutos. Os frutos foram banhados na solução com fungicida (1%) e, posteriormente, feridos na região equatorial, a uma profundidade de 3 mm e os ferimentos tratados com 20 µL da suspensão da levedura ( $1 \times 10^7$  células/mL). Em seguida, os frutos foram armazenados em caixas de propileno com tampa (A x L x C = 14 x 30 x 36,5 cm), armazenados a 25 e 10°C  $\pm$  3°C e 90  $\pm$  3% UR.

Para a avaliação da densidade populacional da levedura, um pedaço de tecido da casca do fruto (aproximadamente 0,5 cm de diâmetro) foi retirado do local do ferimento, com auxílio de um bisturi e, transferido para tubos Falcon® de 50 mL, contendo 10 mL de tampão fosfato de potássio estéril 0,05 M, pH 7,0. Posteriormente, cada amostra foi macerada e foram feitas diluições seriadas ( $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ ). Aliquotas de 100 µL de cada diluição foram plaqueadas em meio YEPD (com

adição de 0,1 g/L de ampicilina) contido em placas de Petri, utilizando-se cinco placas para cada diluição. As culturas foram incubadas em estufa para B.O.D. a 25°C por 72 horas e a avaliação foi realizada através da contagem de unidades formadoras de colônias. O monitoramento da população da levedura se deu a cada dois dias, a partir do sexto dia, até 16 dias de armazenamento a 25°C, e a cada cinco dias, até 20 dias de armazenamento a 10°C.

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, a comparação das médias foi realizada pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

### **3.10. Efeito da aplicação de diferentes métodos de controle da podridão azeda nos parâmetros de qualidade de frutos cítricos**

Este ensaio buscou avaliar o efeito da aplicação de diferentes métodos de controle da podridão azeda na alteração da qualidade dos frutos cítricos ao longo do tempo.

Para a realização do experimento, frutos de laranja Pêra, não tratados, trazidos diretamente do campo, foram lavados com detergente neutro e desinfestados superficialmente com hipoclorito de sódio a 0,1%, por três minutos (FRANCO & BETTIOL 2002, modificado).

Posteriormente, os frutos foram tratados de acordo com os resultados mais promissores obtidos nos ensaios anteriores. Para esse ensaio foram utilizados os seguintes tratamentos: 1) levedura (ACBL-42) sozinha; 2) termoterapia (52°C/3 min.); 3) levedura + termoterapia; 4) Fungicida (1%); 5) Fungicida (1%) + levedura; 6) Fungicida (2%) e 7) Controle (frutos tratados apenas com água).

Após os tratamentos, os frutos foram separados em grupos de três repetições, armazenados em caixas de propileno com tampa, em ambiente de câmara fria a 10°C ± 3°C e 80% ± 3°C UR, por um período de quatro semanas.

Para a avaliação das análises de qualidade, foram retiradas amostras de seis frutos, sendo a primeira 24 horas após a aplicação dos tratamentos e, as demais semanalmente até o final do experimento (7, 14, 21 e 28 dias). As análises de qualidade compreenderam a determinação do rendimento do suco, de sólidos

solúveis totais (SST) expresso em °Brix, da acidez total titulável (ATT) e de “ratio”. Utilizou-se de um delineamento inteiramente casualizado, com três repetições, sendo seis frutos por repetição.

### 3.10.1. Determinação do rendimento do suco

Para a medição da porcentagem de suco, as amostras foram pesadas em balança analítica obtendo o valor de massa total em quilogramas e, posteriormente, os frutos foram processados em máquina extratora, para a coleta do suco. A porcentagem do suco foi determinada por meio do cálculo da fórmula: % rendimento de suco =  $(MS/MF) \times 100$ , onde MS = massa do suco e MF = massa dos frutos.

**Tabela 1.** Valores de referência da porcentagem de suco dos cultivares (PIO et al., 2005).

<b>Cultivares</b>	<b>Média do rendimento de suco (%)</b>
Laranjas	40-60
Tangerinas e tangor	35-55
Limões e limas ácidas	35-55
Pomelo	35-45

### 3.10.2. Teor de Sólidos Solúveis Totais - °Brix

O teor de sólidos solúveis totais foi determinado em aparelho refratômetro digital, com resultados expressos em °Brix. Os valores da leitura do °Brix correspondem diretamente à porcentagem de sólidos solúveis totais do suco cítrico, com base em massa (REED; HENDRIX; HENDRIX, 1986).

**Tabela 2.** Valores de referência de sólido solúveis totais (°Brix) suco dos cultivares (PIO et al., 2005).

<b>Cultivares</b>	<b>Média de °Brix</b>
Laranjas com baixa acidez, laranjas, tangerinas e tangor	8-16 °Brix
Limões e limas ácidas	6-12 °Brix
Pomelo	8-10 °Brix

### **3.10.3. Acidez total titulável (ATT)**

Para a obtenção da acidez titulável, utilizou-se um béquer graduado (250 mL) onde foram adicionados 100 mL de água destilada e pipetados 25 mL da amostra de suco. Adicionou-se também ao béquer, cerca de cinco gotas do indicador fenolftaleína em solução alcoólica 1%. A solução foi misturada através de um agitador magnético. Posteriormente, o eletrodo do pHmetro foi mergulhado na solução contida no béquer e verificado o pH de cada amostra. Sob agitação constante, foi titulado na amostra NaOH 0,3125 N até o pH = 8,2 (ou ponto de viragem do indicador: de incolor para rosa claro), utilizando titulador automático. Os resultados foram expressos % (g de ácido cítrico/100 mL da amostra) (REED; HENDRIX; HENDRIX, 1986).

**Tabela 3.** Valores de referência da porcentagem da porcentagem de acidez titulável dos cultivares (PIO et al., 2005).

<b>Cultivares</b>	<b>Média de acidez titulável (%)</b>
Laranjas com baixa acidez	0,1-0,5
Laranjas, Tangerinas e tangor	0,5-2,0
Limões e limas ácidas	4,0-7,0
Pomelo	0,5-1,5

#### **3.10.4. “Ratio”**

Os valores de “ratio” foram calculados pela divisão do teor de sólido solúveis totais (SST) pela acidez total titulável (ATT).

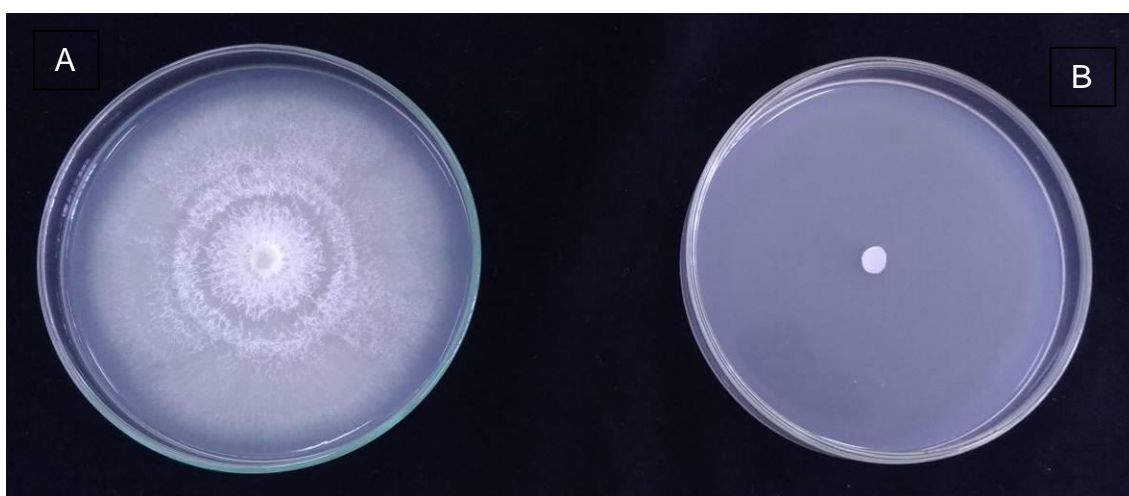
#### **3.10.5. Análises estatísticas**

Os dados coletados foram submetidos à análise de variância (Teste F) e, em caso de significância as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Utilização de diferentes doses de guazatine no desenvolvimento micelial de *Geotrichum citri-aurantii*

Todas as dosagens de fungicida (0,05%; 0,1%; 0,2%; 0,4%; 0,8%) utilizadas inibiram 100% o crescimento micelial de *G. citri-aurantii*, como ilustrado na Figura 3.

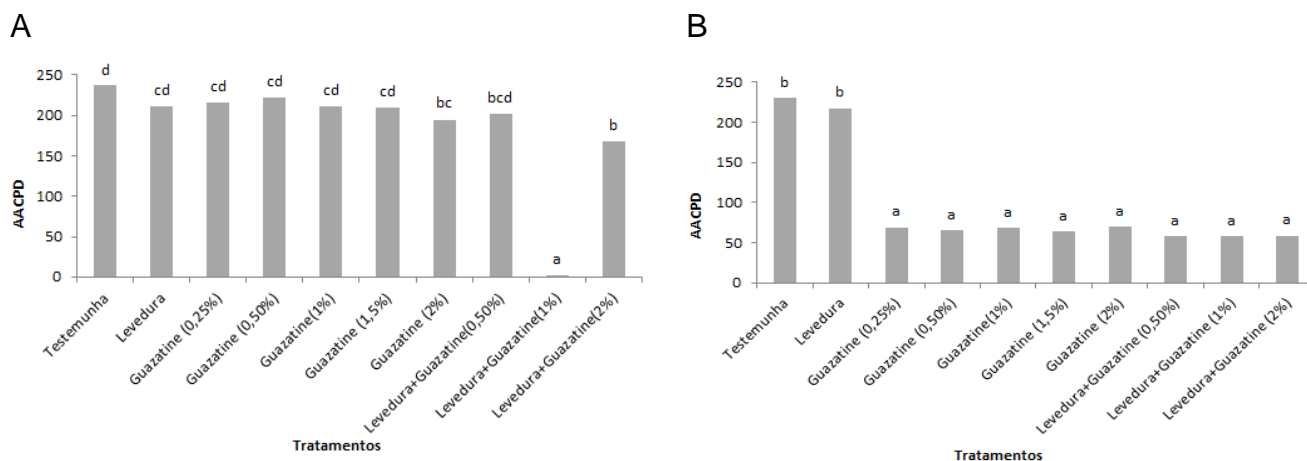


**Figura 3.** Crescimento micelial de *Geotrichum citri-aurantii* em meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA) acrescido de guazatine. (A) Controle (BDA + 0,1 água); (B) BDA + guazatine a 0,1%.

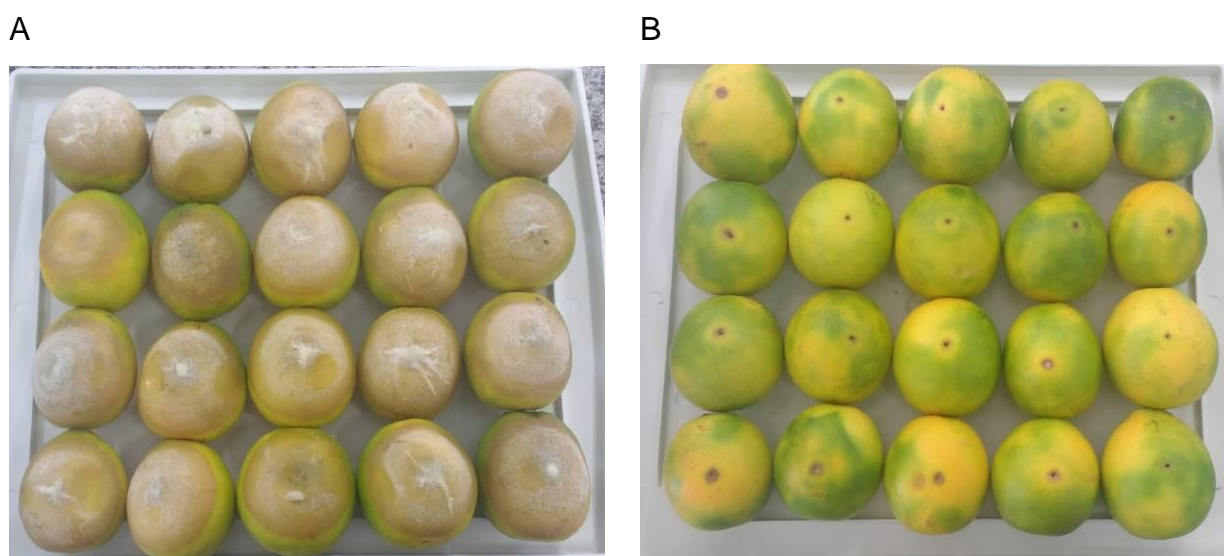
### 4.2. Controle da podridão azeda pela associação da levedura *Sporobolomyces koalae* e do fungicida guazatine

Quando se avaliou a severidade da doença, após os tratamentos dos frutos de laranja Pêra com diferentes doses do fungicida associadas, ou não, com a levedura para o controle da podridão azeda, verificou-se que, com exceção da levedura sozinha, os demais tratamentos diminuíram, significativamente, o tamanho da lesão da doença, quando os mesmos foram aplicados de forma curativa. Os melhores tratamentos de forma preventiva foram guazatine a 2%, associado ou não com a levedura; os tratamentos onde se associaram as menores doses 0,5% e 1,0%

do fungicida com a levedura, sendo que, os frutos que receberam o tratamento com a levedura + guazatine (1%) apresentaram 100% de controle (Figuras 4 e 5).

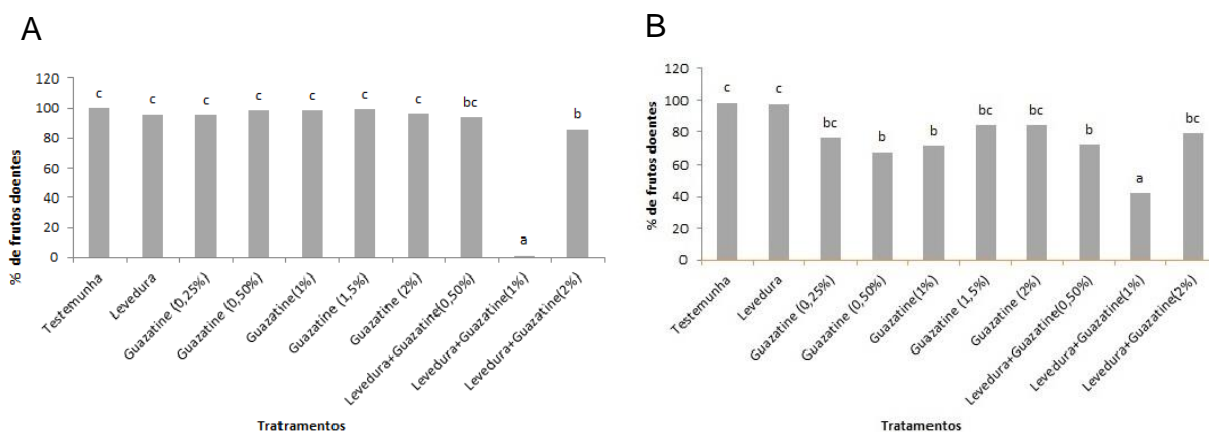


**Figura 4.** Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para o diâmetro médio (mm) da lesão causada por *Geotrichum citri-aurantii*, após o tratamento preventivo (A) e curativo (B) com diferentes doses de guazatine associados, ou não, com *Sporobolomyces koalae* (ACBL-42). Os valores médios marcados com a mesma letra minúscula não são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).



**Figura 5.** Frutos de laranja Pêra após tratamento com guazatine (1%) associado com *Sporobolomyces koalae* (ACBL-42). Tratamento testemunha (A) e tratamento com guazatine (1%) associado com ACBL-42 (B).

Os dados relacionados à incidência da podridão azeda, após tratamento preventivo e curativo com diferentes doses do fungicida combinadas, ou não, com a levedura encontram-se ilustrados na Figura 6. De acordo com os resultados obtidos, observou-se que o melhor tratamento foi quando se utilizou o fungicida a 1% associado com a levedura, apresentando aproximadamente 100% e 60% de controle nos frutos tratados preventivamente e curativamente, respectivamente.

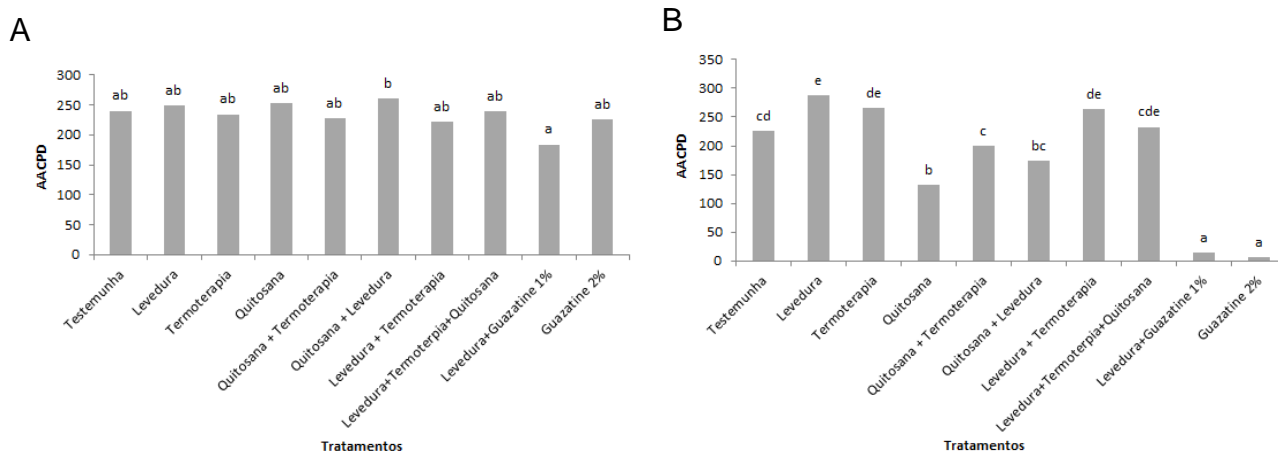


**Figura 6.** Porcentagem de frutos doentes de laranja Pêra após o tratamento preventivo (A) e curativo (B) com diferentes dosagens de guazatine associadas, ou não, com *Sporobolomyces koalae* (ACBL-42). Os valores médios marcados com a mesma letra minúscula não são significativamente diferentes, de acordo com o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

### 4.3. Combinação dos métodos químico, biológico, físico e natural para controle da podridão azeda em frutos cítricos

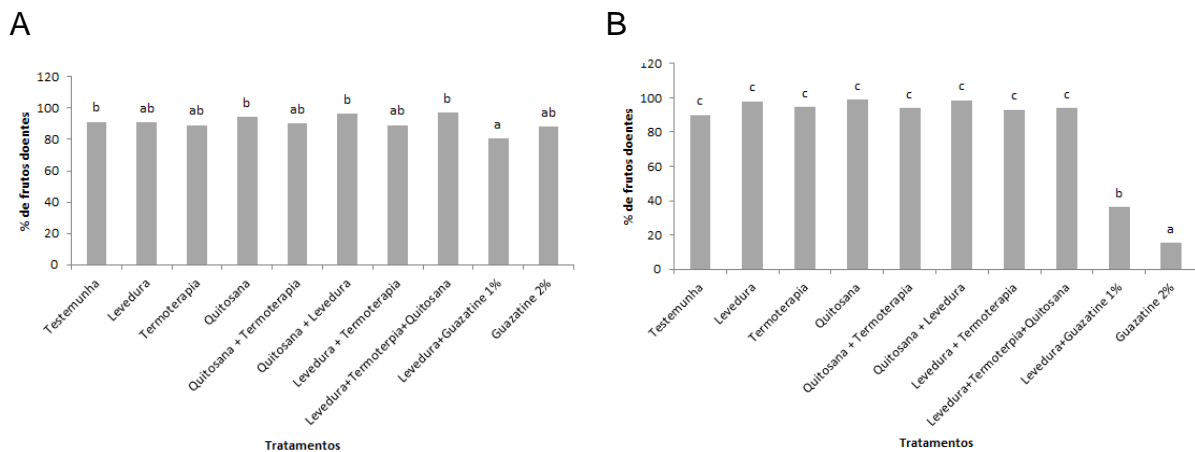
Os resultados apresentados na Figura 7 mostram que nenhum dos tratamentos aplicados em frutos de laranja Pêra para controle da podridão azeda foi eficiente, quando aplicados de forma preventiva. Por outro lado, quando os frutos foram tratados após a inoculação do patógeno (tratamento curativo), o fungicida na dose de 2%, fungicida a 1% associado com a levedura e, quitosana (2%) foram os mais eficientes, diminuindo, significativamente, o tamanho da lesão de *G. citri-aurantii*.





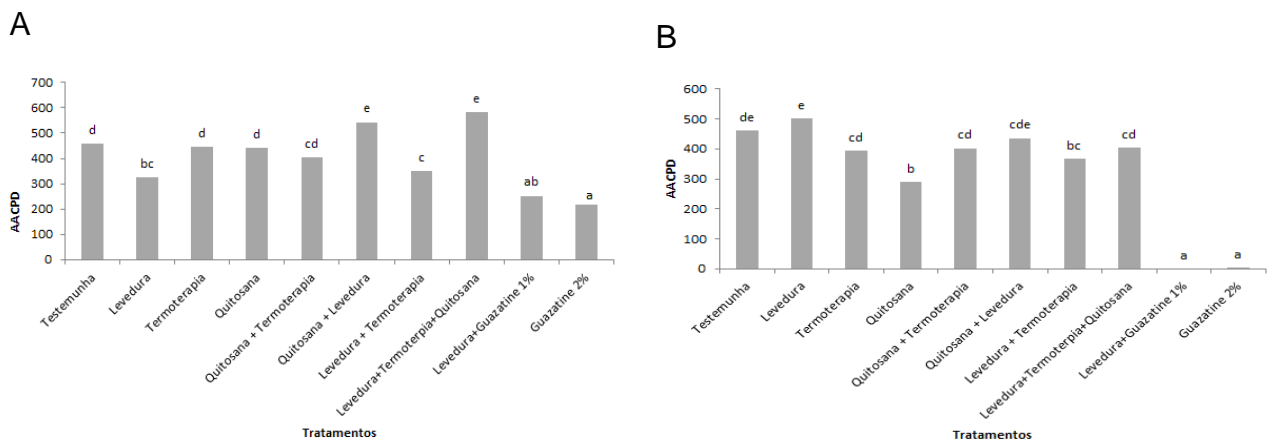
**Figura 7.** Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para o diâmetro médio (mm) da lesão causada por *Geotrichum citri-aurantii*, após o tratamento preventivo (A) e curativo (B) com diferentes métodos de controle, como termoterapia, biológico, químico e natural, associados ou não, em frutos de laranja Pêra. Os valores médios marcados com a mesma letra minúscula não são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

Com relação à incidência da doença, os dados apresentados na Figura 8 mostram que, quando os frutos foram tratados preventivamente com o fungicida a 1% combinado com a levedura, a porcentagem de frutos doentes foi, significativamente, menor, quando comparado com a testemunha, apresentando 20% de controle. Esse mesmo tratamento apresentou 64% de controle, seguido do tratamento com fungicida na maior dose (2%) com 84,5% de controle, quando os frutos foram tratados curativamente.



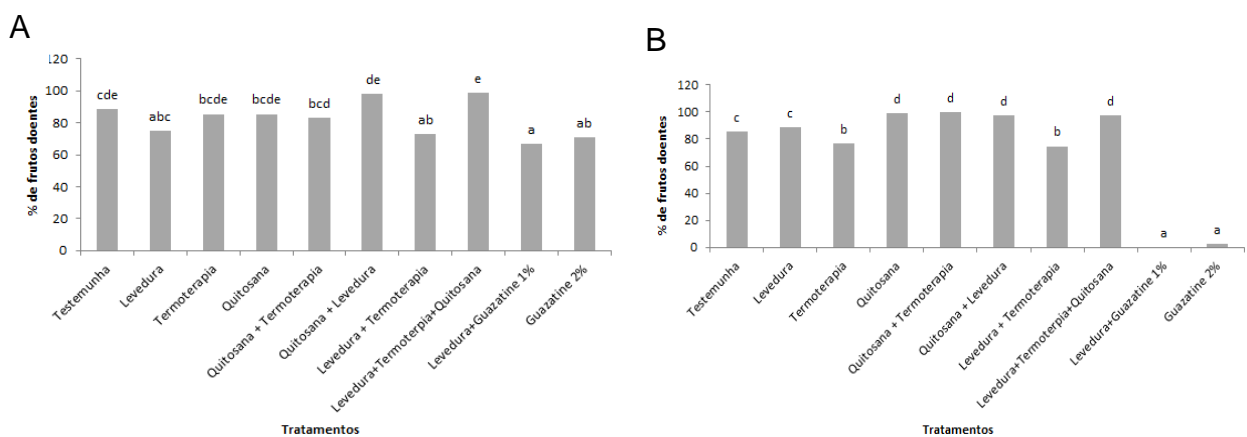
**Figura 8.** Porcentagem de frutos de laranja Pêra com sintomas de podridão azeda, após tratamento preventivo (A) e curativo (B) com diferentes métodos de controle para *Geotrichum citri-aurantii*, como termoterapia, biológico, químico e natural, associados ou não. Os valores médios marcados com a mesma letra minúscula não são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

Para a variedade tangor Murcott (Figura 9), quando se avalia a severidade da doença, após o tratamento preventivo por meio de diferentes métodos de controle associados ou não, pode-se notar que os melhores tratamentos foram obtidos com o fungicida (2%) e na menor dose (1%) associado com a levedura, apresentando, significativamente, os menores tamanhos de lesões nos frutos e não diferindo entre si, porém, diferindo dos tratamentos onde se utilizou a levedura sozinha ou combinada com a termoterapia, que também, ficaram entre os melhores tratamentos diferindo da testemunha. Quando se combinaram os três métodos de controle e o tratamento em que se associou quitosana e levedura, os mesmos acentuaram o tamanho da lesão, em comparação com o tratamento testemunha. Quando os frutos de tangor Murcott foram tratados de forma curativa, os melhores tratamentos foram o fungicida a 2% e na menor dose (1%) associado com a levedura, apresentando 100% de controle, seguido do tratamento com quitosana, que apresentou menor tamanho da lesão.



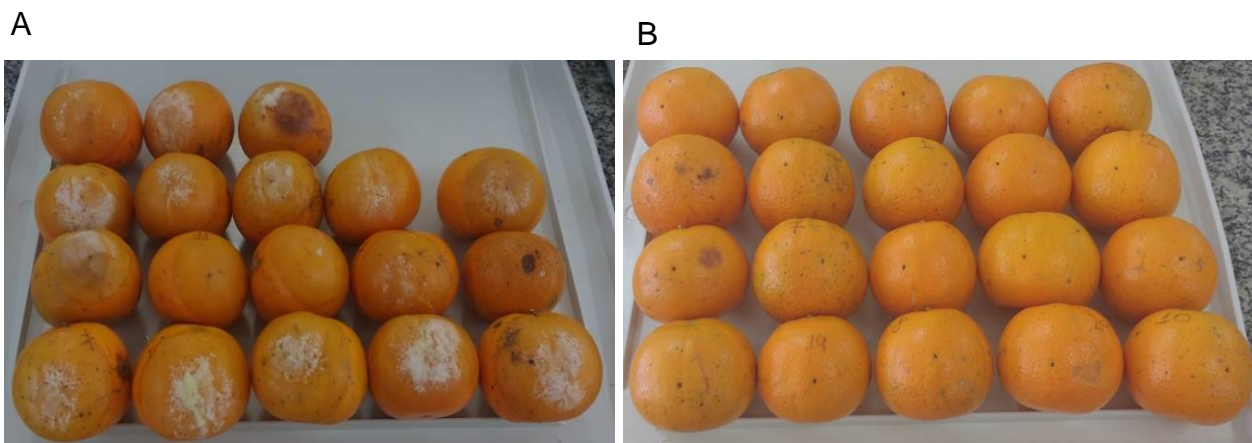
**Figura 9.** Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para o diâmetro médio (mm) da lesão causada por *Geotrichum citri-aurantii*, após o tratamento preventivo (A) e curativo (B) com diferentes métodos de controle, como termoterapia, biológico, químico e natural, associados ou não, em frutos de tangor Murcott. Os valores médios marcados com a mesma letra minúscula não são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey (P <0,05).

Quando se avalia os dados de porcentagem de frutos doentes (Figuras 10 e 11), os melhores tratamentos foram: fungicida a 2% e na menor dose (1%) associado com a levedura, apresentando 98 e 100% de controle, respectivamente, quando os frutos foram tratados de forma curativa.



**Figura 10.** Porcentagem de frutos de tangor Murcott com sintomas de podridão azeda após tratamento preventivo (A) e curativo (B) com com diferentes métodos

para o controle de *Geotrichum citri-aurantii*. Os valores médios marcados com a mesma letra minúscula não são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

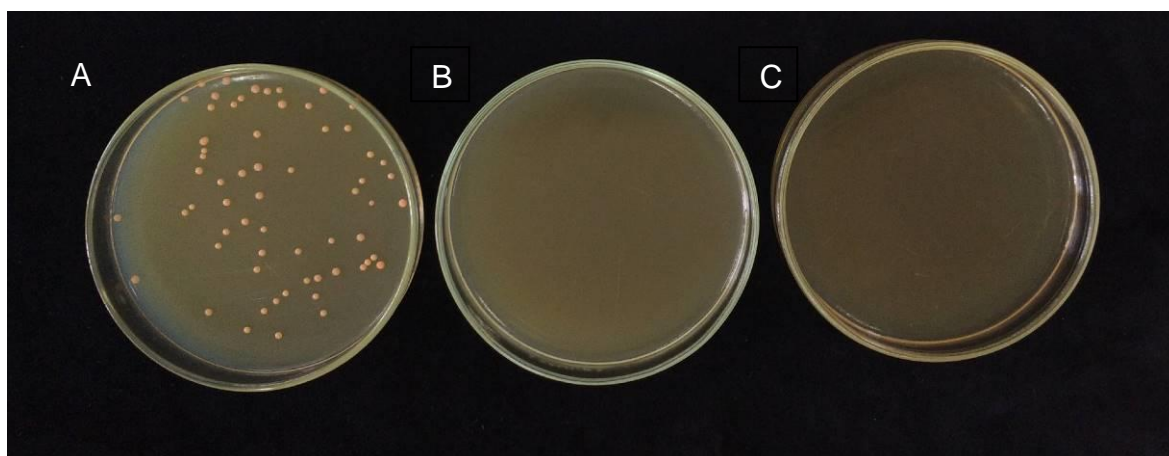


**Figura 11.** Frutos doentes de tangor Murcott após tratamento com guazatine (1%) associadas com *Sporobolomyces koalae* (ACBL-42). Tratamento testemunha (A) e tratamento com guazatine (1%) associado a ACBL-42 (B).

#### 4.4. Interações *in vitro*

##### 4.4.1. Sobrevivência de *Sporobolomyces koalae* na presença do fungicida guazatine

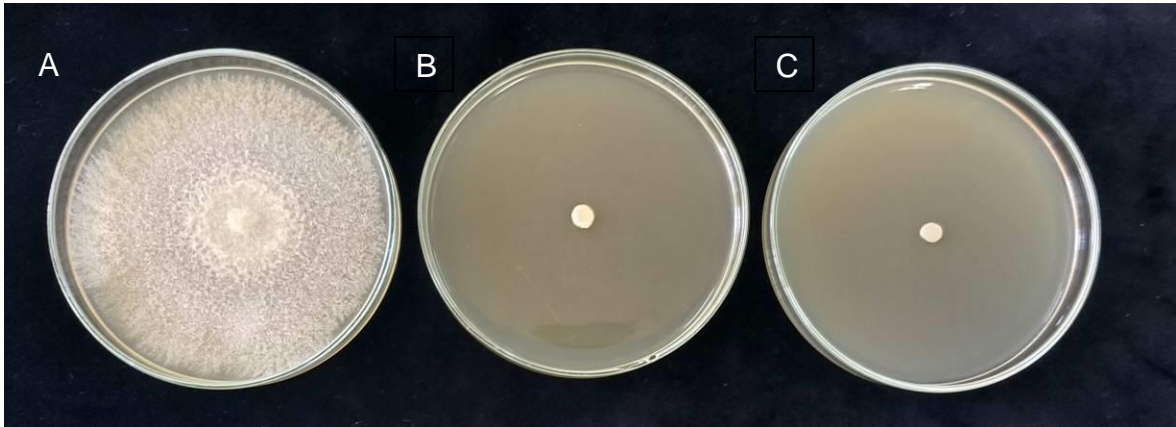
Referente à sobrevivência da levedura em meio de cultura YEPD acrescido ou não de fungicida, os resultados mostraram que a levedura foi incapaz de crescer em meio contendo guazatine, como ilustrado na Figura 12.



**Figura 12.** Sobrevivência de *Sporobolomyces koalae* ACBL-42 em meio YEPD (A), em meio YEPD + fungicida guazatine (1%) (B) e, em meio YEPD + fungicida guazatine (2%).

#### **4.4.2. Produção de compostos termoestáveis produzidos por *Sporobolomyces koalae*, em meio de cultura acrescido do fungicida guazatine**

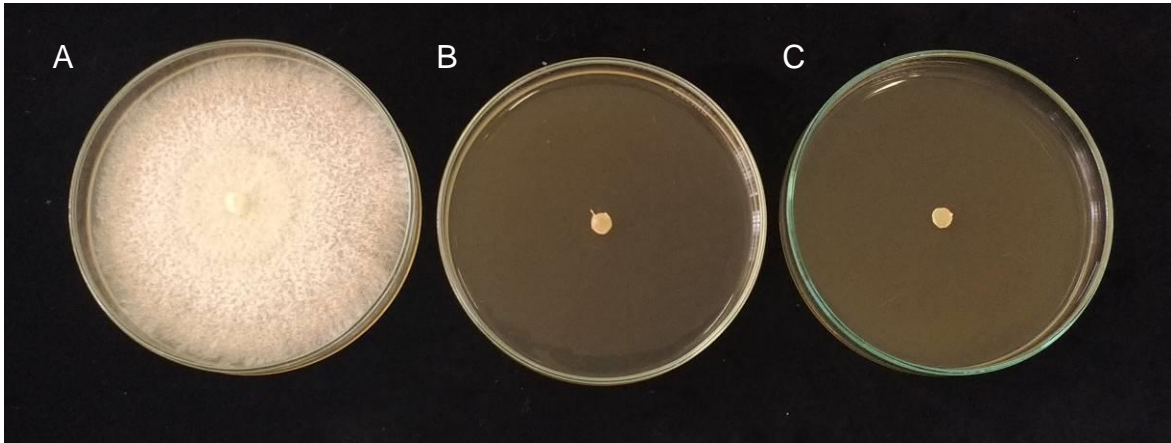
Pelos resultados apresentados é possível verificar que a levedura ACBL-42 não produz substância antifúngica que suporta a alta temperatura e, em quantidade suficiente para inibir o crescimento de *G. citri-aurantii*, conforme ilustrado na Figura 13. No entanto, quando a levedura foi cultivada em meio YEPD acrescido de fungicida, verificou-se que o meio de cultivo afetou o crescimento da levedura e que a inibição de *Geotrichum* em um novo meio contendo YEPD + o meio de cultivo contendo o fungicida se deu em função do fungicida. O que significa que a alta temperatura não afetou a viabilidade do produto.



**Figura 13.** Avaliação de produção de compostos termoestáveis produzidos por *Sporobolomyces koalae* mediante a presença do fungicida guazatine em diferentes dosagens. Testemunha – YEPD + levedura (A), YEPD + guazatine a 1% (B) e YEPD + guazatine a 2% (C).

#### **4.4.2. Produção de compostos antifúngicos livres de células de *Sporobolomyces koalae*, em meio de cultura acrescido do fungicida guazatine**

Os testes que analisaram a produção de compostos antifúngicos livres de células da levedura demonstraram que a levedura ACBL-42 não produz substância antifúngica em quantidade suficiente para inibir o crescimento de *G. citri-aurantii* (Figura 14). Como ocorreu no estudo sobre a produção de metabólitos termoestáveis, a inibição de *Geotrichum* em um novo meio contendo YEPD + o meio de cultivo contendo o fungicida se deu em função do fungicida e não de metabólitos produzidos pelo microrganismo.

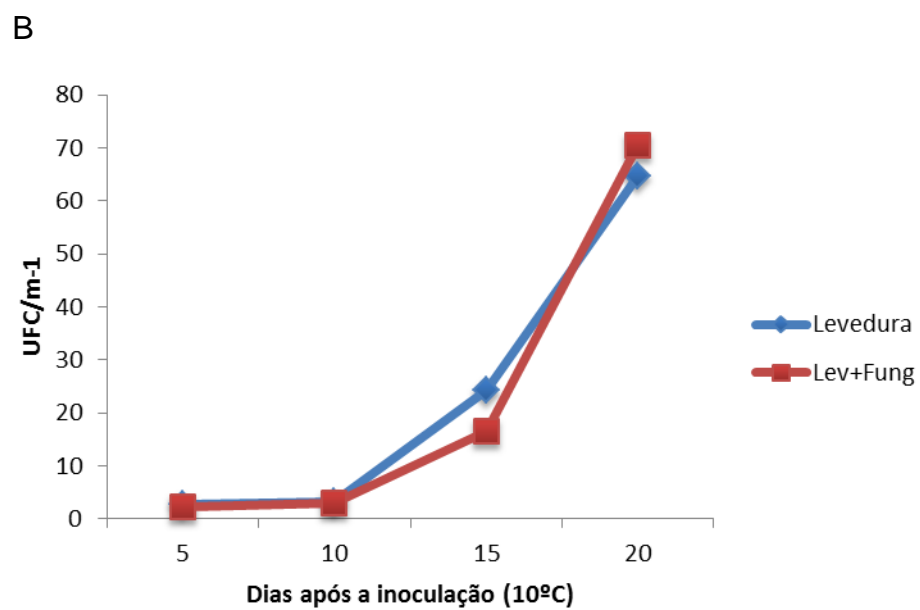
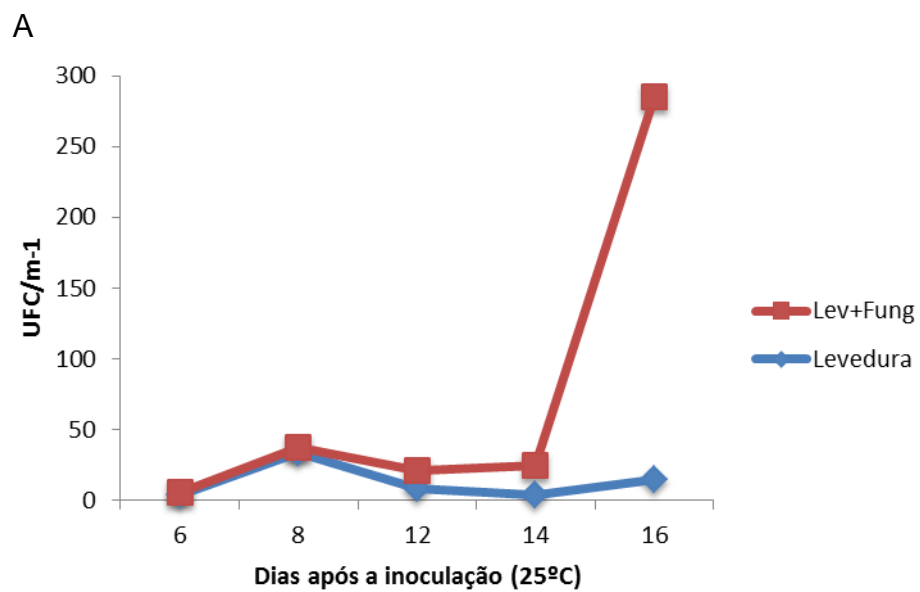


**Figura 14.** Avaliação de produção de compostos livres de células de *Sporobolomyces koalae* mediante a presença do fungicida guazatine em diferentes dosagens. Testemunha (A), YEPD com guazatine a 1% (B) e YEPD com guazatine a 2% (C).

#### **4.5. Avaliação *in vivo* da densidade populacional de *Sporobolomyces koalae*, após tratamento dos frutos com a levedura associada, ou não, ao fungicida guazatine (1%)**

Pelos resultados obtidos, foi possível verificar que a temperatura afetou o crescimento e a sobrevivência da levedura nos frutos cítricos, como ilustrado na Figura 15. A 25°C, a levedura apresentou maior crescimento, quando comparado à temperatura mais baixa (10°C). No entanto, a 10°C, a levedura apresenta um período de sobrevivência maior nos frutos de laranja Pêra. Os resultados sugerem que o fungicida favorece a sobrevivência e o crescimento da levedura, principalmente, quando os frutos tratados são armazenados em temperaturas mais baixas.





**Figura 15.** Densidade populacional de *Sporobolomyces koalae* ACBL-42, aplicadas em fermentos de frutos cítricos armazenados a 25°C (A) ou 10°C (B). Cada ponto ou coluna representa a média de cinco repetições.



## 4.6. Efeito da aplicação de diferentes métodos de controle da podridão azeda nos parâmetros de qualidade de frutos cítricos

Os dados referentes à porcentagem de rendimento do suco, os teores de sólidos solúveis totais, a acidez titulável e valores de “ratio”, após os tratamentos dos frutos cítricos com termoterapia; com levedura ABLC-42 sozinha ou associada com o tratamento térmico; com guazatine (1%) associado ou não à levedura; guazatine (2%) e o controle, encontram-se nas Tabelas 4 a 15.

### 4.6.1. Rendimento de suco

Os valores referentes ao rendimento de suco mostraram que houve diferença significativa entre os tratamentos testados e o tempo de armazenamento dos frutos. Não houve diferença na interação dos dois fatores. O maior rendimento de suco foi obtido quando os frutos foram tratados com a levedura e o guazatine a 1%, no entanto, esse tratamento não diferiu dos demais métodos alternativo de controle.

**Tabela 4.** Valores correspondentes à soma de quadrado, quadrado médio, significância e coeficiente de variação do efeito de diferentes tratamentos em frutos de laranja Pêra armazenados a 10°C, em relação à porcentagem de rendimento de suco.

<b>Coeficiente de variação</b>	<b>Grau de liberdade</b>	<b>Soma dos quadrados</b>	<b>Quadrado Médio</b>	<b>F</b>
Tratamento (T)	6	77,7289	12,9548	2,6179*
Tempo de armazenamento (A)	4	190,3851	47,5962	9,6182**
T x A	24	75,3415	3,1392	0,6344 <sup>ns</sup>
Coeficiente de (%)	Variação			4,32

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ ); \* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ ); ns não significativo ( $p \geq .05$ )

**Tabela 5.** Influência de diferentes tratamentos na porcentagem do rendimento de suco de laranja Pêra armazenada a 10°C.

<b>Tratamentos</b>	<b>Rendimento do suco (%)</b>
Testemunha (água)	49,55 b <sup>(1)</sup>
ACBL-42	52,11 a
Termoterapia	52,00 ab
Fungicida (1%)	52,12 a
Fungicida (1%) + ACBL-42	51,12 ab
Fungicida (2%)	51,93 ab
Termoterapia + ACBL-42	51,27 ab

<sup>(1)</sup>Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ( $p \geq 0,05$ ).

**Tabela 6.** Influência do tempo de armazenamento (em dias) a 10°C, em frutos de laranja Pêra com diferentes tratamentos, na porcentagem de rendimento de suco de laranja Pêra.

<b>Tempo de armazenamento (dias)</b>	<b>Rendimento de suco (%)</b>
1	53,9333 a
7	51,6619 b
14	50,4333 b
21	51,0047 b
28	50,1761 b

<sup>(1)</sup>Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ( $p \geq 0,05$ ).

#### **4.6.2. Teor de sólidos solúveis totais - °Brix**

Com relação aos teores de sólidos solúveis, de um modo geral, com exceção da interação entre os fatores, os tratamentos e o tempo de armazenamento não apresentaram diferenças significativas (Tabela 7).

**Tabela 7.** Valores correspondentes a soma de quadrado, quadrado médio, significância e coeficiente de variação do efeito da aplicação de diferentes tratamentos em frutos de laranja Pêra armazenados a 10°C, em relação aos valores de sólidos solúveis (°Brix)

<b>Coeficiente de variação</b>	<b>Grau de liberdade</b>	<b>Soma dos quadrados</b>	<b>Quadrado Médio</b>	<b>F</b>
Tratamento (T)	6	1,4360	0,2393	0,9085 <sup>ns</sup>
Tempo de armazenamento (A)	4	1,7803	0,4451	1,6896 <sup>ns</sup>
T x A	24	11,4049	0,4752	1,8039 <sup>*</sup>
Coeficiente de variação (%)				4,69

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ ); \* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ ); ns não significativo ( $p \geq .05$ ).

**Tabela 8.** Valores médios do teor de sólidos solúveis totais (°Brix) de laranja Pêra armazenado a 10°C em função de diferentes tratamentos.

<b>Tratamentos</b>	<b>Tempo de armazenamento (dias)</b>				
	<b>1</b>	<b>7</b>	<b>14</b>	<b>21</b>	<b>28</b>
Testemunha	10.5000 aAB	11.1667 aAB	11.4333 aAB	10.2667 aB	11.4667 aA
ACBL-42	11.0667 aA	11.4000 aA	11.0667 abA	10.8000 aA	11.4667 aA
Termoterapia	11.1000 aA	10.4333 aA	11.3000 aA	10.9000 aA	11.2000 aA
Fungicida (1%)	11.0667 aA	10.8333 aA	11.1000 abA	11.4000 aA	10.7000 aA
Fungicida (1%) + ACBL-42	10.8000 aAB	11.4333 aA	10.0000 bB	10.6000aAB	11.2000 aA
Fungicida (2%)	10.4333 aA	10.7333 aA	11.4333 aA	10.9333 aA	11.1667 aA
Termoterapia + ACBL-42	10.8000 aA	11.1333 aA	10.4000 abA	10.7333 aA	10.9000 aA

<sup>(1)</sup>Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ( $p \geq 0,05$ ).

#### **4.6.3.Acidez total titulável (ATT)**

Os tratamentos, independente do tempo de armazenamento dos frutos, não afetaram os valores de acidez total titulável (Tabelas 9, 10 e 11).

**Tabela 9.** Valores correspondentes à soma de quadrado, quadrado médio, significância e coeficiente de variação do efeito da aplicação de diferentes tratamentos em frutos de laranja Pêra armazenados a 10°C, em relação acidez titulável (g de ácido cítrico/100 mL de amostra).

<b>Coeficiente de variação</b>	<b>Grau de liberdade</b>	<b>Soma dos quadrados</b>	<b>Quadrado Médio</b>	<b>F</b>
Tratamento (T)	6	0,0176	0,0029	0,8891 <sup>ns</sup>
Tempo de armazenamento (A)	4	0,0275	0,0068	2,0757 <sup>ns</sup>
T x A	24	0,0703	0,0029	0,8844 <sup>ns</sup>
Coeficiente de variação (%)				7,46

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ ); \* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ ); ns não significativo ( $p \geq .05$ ).

**Tabela 10.** Influência de diferentes tratamentos nos valores de acidez titulável (g de ácido cítrico/100 mL de amostra) em laranja Pêra armazenada a 10°C.

<b>Tratamentos</b>	<b>g de ácido cítrico/100 mL de amostra</b>
Testemunha (água)	0,7891 a <sup>(1)</sup>
ACBL-42	0,7864 a
Termoterapia	0,7569 a
Fungicida (1%)	0,7599 a
Fungicida (1%) + ACBL-42	0,7555 a
Fungicida (2%)	0,7773 a
Termoterapia + ACBL-42	0,7747 a

<sup>(1)</sup>Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ( $p \geq 0,05$ ).

**Tabela 11.** Influência do tempo de armazenamento (em dias) a 10°C, em frutos de laranja Pêra com diferentes tratamentos nos valores de acidez titulável (g de ácido cítrico/100 mL de amostra).

Tempo de armazenamento (dias)	g de ácido cítrico/100 mL de amostra
1	0,7840 a
7	0,7752 a
14	0,7726 a
21	0,7404 a
28	0,7847 a

<sup>(1)</sup>Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ( $p \geq 0,05$ ).

#### 4.6.4. “Ratio”

Os resultados referentes ao “ratio” mostraram que apenas o tempo de armazenamentos dos frutos, após a aplicação dos tratamentos, apresentou diferenças com relação aos valores de “ratio” (Tabelas 12 e 13).

**Tabela 12.** Valores correspondentes à soma de quadrado, quadrado médio, significância e coeficiente de variação do efeito de diferentes tratamentos em frutos de laranja Pêra armazenados a 10°C, em relação aos valores médios de “ratio” (sólidos solúveis/ acidez titulável).

Coeficiente de variação	Grau de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado Médio	F
Tratamento (T)	6	16,5558	2,7593	1,6567 <sup>ns</sup>
Tempo de armazenamento (A)	4	22,3422	5,5855	3,3536 <sup>*</sup>
T x A	24	56,0203	2,3341	1,4015 <sup>ns</sup>
Coeficiente de variação (%)				9,11

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ ); \* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ ); ns não significativo ( $p \geq .05$ ).

**Tabela 13.** Influência do tempo de armazenamento (em dias) a 10°C, em frutos de laranja Pêra com diferentes tratamentos, nos valores médios de “ratio” (sólidos solúveis/ acidez titulável).

<b>Tempo de armazenamento (dias)</b>	<b>sólidos solúveis/ acidez titulável</b>
1	13,3190 b
7	14,3190 ab
14	14,2190 ab
21	14,7285 a
28	14,2285 ab

<sup>(1)</sup>Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ( $p \geq 0,05$ ).

## 5. DISCUSSÃO

A utilização de métodos alternativos, para o controle de doenças de pós-colheita de frutos, se apresenta como uma tecnologia aplicável e promissora. Alternativas como: leveduras como agentes de controle biológico, uso de produtos naturais, como por exemplo, quitosana e o uso de tratamentos físicos, como a termoterapia, são possíveis escolhas para a redução total ou parcial de agroquímicos, os quais são frequentemente utilizados durante o beneficiamento e armazenamento de frutos para controle de fitopatógenos.

Neste estudo, os testes *in vitro* mostraram o potencial do fungicida guazatine para controle de *G. citri-aurantii*, proporcionando 100% de inibição no seu crescimento micelial. No entanto, nos ensaios *in vivo*, os tratamentos do produto com as menores dosagens não foram tão eficientes para o controle da podridão azeda. Tal fato pode ser justificado, considerando que em condições *in vivo*, além do ambiente, outros fatores podem ter influenciado diretamente nos resultados, como por exemplo, a natureza dos componentes, neste caso os frutos, o genótipo do hospedeiro e a interação do microrganismo no local da infecção, conforme mencionado por outros autores (PLAZA et al., 2004).

A utilização do fungicida guazatine na dose de 1% em associação com a levedura *Sporobolomyces koalae* (ACBL-42) foi o melhor controle da doença em frutos de laranja Pêra e tangor Murcott, com 100% de frutos sadios (Fig. 4 e Fig.10). A aplicação da levedura ACBL-42 sozinha não diferiu do tratamento dos frutos com a combinação levedura+fungicida (1%), quando aplicados de forma preventiva. Resultados semelhantes foram relatados por Moretto et al. (2014), quando foram testadas associações entre o fungicida imazalil e diferentes agentes de controle biológico contra *Penicillium digitatum*, causador do bolor verde em citros. Segundo os autores, os testes realizados de forma preventiva e curativa obtiveram resultados de até 100% de controle da doença através de um tratamento com um quarto da dose de imazalil associado com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (ACB-K1). Arras et al. (2002) verificaram que a aplicação das leveduras antagonistas *Pichia guilliermondii* e *Candida oleophila*, utilizadas em combinação com diferentes doses de tiabendazol (0,1 a 1,2 g/L), alcançou uma proteção, significativamente, maior que

o uso de cada um dos tratamentos separadamente. Outros autores também encontraram resultados que corroboram com os encontrados no respectivo estudo, no que diz respeito à aplicação de agentes de controle biológico juntamente com doses reduzidas de fungicidas (KINAY et al., 2001; USALL et al., 2001; ZHOU et al., 2002).

Em se tratando, especificamente do fungicida guazatine, Garcia et al. (1999) discorreram sobre o espectro de ação desse produto, que pertence ao grupo de fungicidas que, quando aplicados à superfície dos órgãos vegetais, agem como uma barreira tóxica, prevenindo a penetração de fungos pela inibição da germinação dos esporos e do tubo germinativo. Em geral tais fungicidas por não serem específicos, são utilizados como protetores de folhagens e de sementes, eliminando os patógenos localizados nas superfícies, especialmente de patógenos de solos.

De acordo com Brown (1988), o uso do guazatine não é autorizado no Brasil, pois segundo o autor, ainda não existe estudos conclusivos sobre o seu metabolismo nos frutos cítricos. De acordo com a ANVISA, seu uso agrícola é permitido em algumas culturas como a batata, o café, pêssego e para tomate. Dessa forma, e não se sabendo se esse fungicida pode ou não gerar compostos prejudiciais à saúde pública, o presente estudo julgou por bem encontrar uma metodologia de combinação de um agente de biocontrole juntamente com doses menores do fungicida, tido como eficiente no controle da doença em países como Austrália e Alemanha (BROWN, 1988), de modo a reduzir a quantidade do princípio ativo no ambiente e, em frutos de citros.

No controle biológico de doenças de pós-colheita, a microflora epifítica natural é a principal fonte de seleção dos agentes de controle biológico (DROBY et al., 2009; LIU et al., 2013), de modo que possa ser isolado microrganismos com alto potencial antagonista para determinado fitopatógeno. Além da seleção, a funcionalidade do antagonista e sua eficácia dependem diretamente de sua sobrevivência e colonização. Diante deste contexto, mesmo que leveduras do gênero *Sporobolomyces* se destaquem como antagonistas a fitopatógenos, o isolado de *S. koalae* utilizado neste estudo não apresentou as características desejáveis para o biocontrole de *G. citri-aurantii*, quando aplicada sozinha.

A combinação de agentes de controle biológico com métodos químicos e físicos tem apresentado um efeito positivo no controle de doenças, tal fato não se



deve apenas à inibição de forma direta do patógeno, mas também, por alguma forma de indução de resistência nos frutos (DROBY et al., 2009). Como exemplo, D'Hallewin et al. (1998) obtiveram um efeito sinérgico contra *P. digitatum* em toranjas, comparável ao controle com o fungicida imazalil, quando o tratamento térmico (37°C, 95% de umidade relativa, durante 72 horas) foi realizado entre as 36 horas após a inoculação do antagonista *Candida famata*. No entanto, pelos resultados apresentados neste estudo, a aplicação da termoterapia (52°C por 3 minutos) em frutos de laranja Pêra e tangor Murcott, para controle da podridão azeda, não foi eficaz. Tal resultado não corrobora com outros autores, Chen et al. (2015) relataram que um tratamento com água quente (45°C por 10 minutos) inibiu efetivamente a germinação de esporos e o alongamento do tubo germinativo de *P. expansum* e *Botrytis cinerea* em frutos de kiwi. Para Nascimento e Santos (2013), a utilização do tratamento térmico (52°C por 3 minutos) foi eficiente no tratamento de doenças de pós-colheita para lima ácida Tahiti. Benato et al. (2001), também, verificaram menor incidência de podridões em pós-colheita de maracujá amarelo, tratado a 42,5°C e 45°C, por oito minutos. Em banana, Sponholz et al (2004) obtiveram uma redução da área lesionada por *Colletotrichum gloesporioides*, quando as frutas foram submetidas ao tratamento térmico (53°C) por 5, 10 e 15 minutos, mostrando a ausência de lesões em frutas mantidas por 20 minutos sob o tratamento térmico.

Dessa forma, podemos afirmar que a eficiência do tratamento térmico é dependente da faixa de temperatura e do período de exposição, sendo mais apropriado para frutas que admitem temperaturas de 50 a 60°C por até 10 minutos (DE BRITO et al., 2008).

Dentro de tratamentos naturais na pós-colheita é comum encontrar bons resultados quando se trata da aplicação de quitosana para controle de doenças. No entanto, no respectivo estudo, a quitosana só foi eficiente na diminuição do tamanho das lesões causadas por *G. citri-aurantii*, não diminuindo a quantidade de frutos doentes. Esse efeito só foi observado quando os frutos de laranja Pêra e de tangor Murcott foram tratados de forma curativa, após a inoculação do fitopatógeno. Resultados obtidos em literatura corroboram parcialmente com os resultados apresentados neste estudo. Liu et al. (2017) investigaram os efeitos da quitosana sobre bolor cinzento e bolor azul, causados por *Botrytis cinerea* e *Penicillium*

*expansum* respectivamente, em frutos de tomate. Segundo os autores, a quitosana apresentou um controle efetivo das duas doenças em tomateiro. Os autores ao fazerem os testes *in vitro*, observaram que quitosana inibiu a germinação dos esporos, afetou o alongamento do tubo germinativo e o crescimento micelial de *B. cinerea* e *P. expansum*, além de causar danos nas membranas plasmáticas dos esporos dos fitopatógenos. Para os autores, os efeitos da quitosana sobre os bolores em frutos de tomate podem estar associados à propriedade fungitóxica direta contra os patógenos e a obtenção de respostas de defesa bioquímica na fruta.

CUQ et al. (1995) relataram que, embora o efeito antimicrobiano da quitosana seja atribuído à propriedade antifúngica, pode ocorrer que o produto atue como uma barreira física entre os nutrientes do fruto e os fungos que atacam os vegetais e frutos frescos e, conseqüentemente, acaba contribuindo para o controle. Alguns pesquisadores explicam a atividade antimicrobiana da quitosana por seus grupos amínicos, que, uma vez em contato com os fluídos fisiológicos, provavelmente são protonados e se ligam a grupos aniônicos desses microrganismos, resultando na aglutinação das células microbianas e inibição do crescimento (KUMAR, 2000; SILVA et al., 2006). No entanto, estudos recentes revelam que o mecanismo da atividade antimicrobiana da quitosana está diretamente relacionado às propriedades físico-químicas do polímero e às características da membrana do organismo (SILVA et al., 2006). Ao contrário dos resultados obtidos no respectivo trabalho, Sharma et al. (2006) obtiveram bons resultados combinando quitosana com outros métodos alternativos para o controle de doenças da pós-colheita de tomateiro. Ainda neste contexto, efeitos sinérgicos ou, aditivos entre microrganismos antagônicos, carbonato de sódio e glicolquitosana (0,2%) foram relatados como sendo eficientes para controlar *P. expansum* em maçãs e citros (EL GHAOUTH et al., 2000). Dessa forma, podemos inferir que os mecanismos de atividade da quitosana frente ao fungo leveduriforme *G. citri-aurantii* não se mostraram totalmente efetivos, devido alguma característica físico-química específica da cultura, onde mesmo criando uma espécie de cicatriz ao redor das lesões, os ensaios com quitosana não apresentaram resultados significativos, quando os frutos foram tratados de forma preventiva. Neste contexto, Fischer et al. (2012) também relatam que a aplicação de quitosana para o controle de pinta preta em goiaba, também, não foi eficiente. E que

cada patossistema pode responder de forma diferenciada (OLIVEIRA, et al., 2004; FISCHER et al., 2012).

Lima et al., (2015), destacam a compatibilidade com produtos químicos como um traço importante para uma utilização adequada de um agente de biocontrole em um cronograma de controle integrado. Um antagonista pode interagir com o patógeno e também com os fungicidas aplicados antes, ou depois da colheita (LIMA et al., 1997; BUCK & BURPEE, 2002; IPPOLITO, et al., 2004). Uma abordagem multifacetada pode ser definida como a integração combinada ou sequenciada dos métodos de controle de campo mais comuns e disponíveis, afim de uma abordagem multiestratégia dirigida principalmente a estratégias preventivas no controle das doenças de pós-colheita, buscando maximizar a eficácia dos agentes de controle biológico pela redução, ao nível mais baixo possível do uso de fungicidas sintéticos (LIMA et al., 2015).

Muitas alternativas ao controle químico são investigadas, mas muitas vezes, quando são utilizadas isoladamente, elas não fornecem um nível de controle eficiente quando comparado aos fungicidas sintéticos (FELIZIANI & ROMANAZZI, 2013). Conway et al. (2004) reitera afirmando que a maioria das alternativas, atualmente investigada, não possui alta capacidade de erradicação e proteção, no entanto, a combinação de dois métodos, ou mais, pode se complementar de modo a superar as falhas de cada um separadamente. As relações existentes entre os fungicidas, fatores ambientais, microrganismos são complexos e difíceis de prever (YANG et al., 2011).

Os dados de interações *in vitro* mostraram que a levedura não produz metabólitos em quantidades suficientes para inibir o crescimento de *G. citri-aurantii* e, que a inibição do crescimento micelial do fitopatógeno observada se deu em função apenas do fungicida.

O fungicida guazatine favoreceu a sobrevivência e o crescimento da levedura (ACBL-42), quando os frutos de laranja Pêra foram tratados com essa combinação e armazenados, tanto em temperatura ambiente (25°C) como em temperaturas mais baixas (10°C). Tal fato pode ser justificado se considerado que microrganismos necessitam de fontes assimiláveis de carbono e que tais fontes podem ser encontradas em moléculas de compostos químicos para produção de energia e aumento da biomassa (PLUMBRIDGE, 2009).

No entanto, para o controle efetivo da podridão azeda são necessários tratamentos aplicados tanto preventivamente no campo, como na pós-colheita de forma curativa, durante o beneficiamento ou, armazenamento dos frutos e, nesse aspecto, os resultados apresentados neste estudo sugerem que a associação da levedura *S. koalae* com fungicida guazatine a 1% apresenta potencial para o controle da podridão azeda e não afeta a qualidade dos frutos cítricos.

## 6. CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos neste estudo, conclui-se que:

- a) A associação da levedura *S. koalae* com 1,0% do fungicida guazatine apresenta potencial para o controle da podridão azeda, quando aplicado de forma curativa, e sua aplicação não afeta a qualidade dos frutos cítricos;
- b) A aplicação da levedura sozinha, em frutos de tangor Murcott, se mostrou eficiente, quando o tratamento foi aplicado de forma preventiva;
- c) O tratamento térmico (52°C por três minutos) de frutos cítricos combinado, ou não, com método biológico (levedura) ou produto natural (quitosana a 2%/3 minutos) não apresentou controle efetivo da doença;
- d) O uso de quitosana (a 2% por 3 minutos) ou, da levedura sozinha, não se mostrou eficiente para o controle da podridão azeda em frutos de laranja Pêra.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, L.S.; BELLON, S.; TORRES, T.Z. A contribuição das ciências e do movimento social para a agroecologia no Brasil. **Com Ciência - SBPC/Labjor**, Campinas, n. 182, out/2016.

AGRIANUAL. **Anuário da Agricultura Brasileira**. São Paulo: informa economics/FNP. 480 p. 2013.

AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**, 5 ed, 2005.

ALMEIDA, L.F.V. **Estudo diagnóstico e taxonômico de cochonilhas (Hemiptera: Coccoidea) associadas às plantas cítricas no estado de São Paulo, Brasil**. 2016. 64f. Dissertação (mestrado) – UNESP, Jaboticabal, 2016.

ARRAS, G.; SCHERM, B.; MIGHELI, Q. Improving biocontrol activity of *Pichia guilliermondii* against post-harvest decay of oranges in commercial packinghouses by reduced concentrations of fungicides. **Biocontrol Science and Technology**, Abingdon, v. 12, n. 5, p. 547-553, 2002.

AZEVEDO, V.V.C.; CHAVES, S.A.; BEZERRA, D.C.; LIA FOK, M.V.; COSTA, A.C.F. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. **Rev. Eletr. de Mater. e Proces.**, v. 2.3, p. 27-34, 2007.

BAUDOIN, A.B.; ECKERT, J.W. Factors influencing the susceptibility of lemon to infection by *Geotrichum candidum*. **Phytopathology**, v. 72, p. 1592–1597, 1982.

BENATO, E.A. Controle de doenças pós-colheita em frutas tropicais. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 25, p.90-93, 1999.

BENATO, E.A.; CIA, P.; SOUZA, N.L. Manejo de doenças de frutas pós-colheita. **Revisão anual de patologia de plantas**, v. 9, p. 403-440. 2001.

BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. **Doenças de Plantas Tropicais: epidemiologia e controle econômico**. São Paulo: Editora Ceres. 229 p., 1996.

BORGES, A.C.G.; COSTA, V.M.H.M. A evolução do agronegócio citrícola paulista e o perfil da intervenção do Estado **Revista Uniara**, n.17/18, 2005/2006, p. 101-124, 2006.

BRITTO, D.; ASSIS, O.B.G. Aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos de revestimento de quitosana como ativo quaternário em maçãs fatiadas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos** [online]. v. 32, p. 599-605, 2012.

BROETTO, L.; COLTRO-RONCATO, S.; MEINERZ, C.C.; DILDEY, O.D.F.; PAZDIORA, P.C.; GONÇALVES, E.D.V.; MORAES, A.J.; HENKEMEIER, N.P.; KUHN, O.J.; STANGARLIN, J.R. Crescimento micelial e produção de

microescleródios de *Macrophomina phaseolina* confrontado com diferentes isolados de *Trichoderma* sp. **Scientia Agraria Paranaensis**, v.13, p. 310-317, 2014.

BROWN, G.E. Factors affecting postharvest development of *Colletotrichum gloeosporioides* in citrus fruits. **Phytopathology**, v. 65, p. 404-409, 1975.

BROWN, G.E. Efficacy of guazatine and iminoctadine for control of postharvest decays of oranges. **Plant Disease**. 72, 906–908, 1988.

BROWN, G.E. **Sour rot. Causal organism and disease cycle**. Gainesville: University of Florida, Institute of Food and Agricultural Science Extension Service Fact Sheet, 137 p. 2003.

BUCK, J.W.; BURPEE, L.L. The effects of fungicides on the phylloplane yeast populations of creeping bentgrass. **Can J Microbiol** v.48, p. 522–529, 2002.

BUTLER, E.E.; FOGLE, D.; MIRANDA, M. *Galactomyces citri-aurantii*, a newly found teleomorfe of *Geotrichum citri-aurantii* the cause of sour rot of citrus fruit. **Mycotaxonomy**, v. 33, v. 197-212, 1988.

CARRÉ, V.; ZANELLA, A.L.; BECKER, A.; STANGARLIN, J.; PAGLIOSA, L.A.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; GONÇALVES JUNIOR, A.C. Fungitoxicidade de quitosana e extrato de *Artemisia camphorata* a *Colletotrichum musae*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, p. 291, 2002.

CHEN, H.; CHENG, Z.; WISNIEWSKI, M.; LIU, Y.; LIU, J. Ecofriendly hot water treatment reduces postharvest decay and elicits defense response in kiwifruit. **Environ. Sci. Pollut. Res.**, v. 22, p.15037-15045, 2015.

CHIEN, P.J.; SHEU, F.; LIN, H.R. Coating citrus (*Murcott tangor*) fruit with low molecular weight chitosan increases postharvest quality and shelf life. **Food Chemistry**, v. 100, p. 1160-1164, 2007.

CITROSUCO. **Cinturão citrícola brasileiro**. 2012. Disponível em: <<http://www.citrosuco.com.br/fischer/fischer/sites/fischer/citrosuco/pomares/laranja/cinturao.html>>. Acesso em: agosto/2017.

COELHO, A.R., DE ANDRADE NÓBREGA, G.M., PAGNOCCA, F.C., HOFFMANN, F.L., HARADA, K.I., HIROOKA, E.Y. Avaliação do potencial antagonico de leveduras, visando biocontrole de deterioração por *Penicillium expansum*. **Semina: Ciências Agrárias**, p. 1879-1892, 2011.

COOK, R.J. & BACKER, K.F. **The nature and practice of biological control of plant pathogens**. St. Paul, APS, 1983, 539p.

COOK, R.J. Biological control of the pathogens: theory to application. **Phytopathology**, 75:25-29, 1985.

CONWAY, W.S.; LEVERENTZ, B.; JANISIEWICZ, W.J.; BLODGETT, A.B.; SAFTNER, R.A.; CAMP, M.J. Integrating heat treatment, biocontrol and sodium bicarbonate to reduce postharvest decay of apple caused by *Colletotrichum*

*acutatum* and *Penicillium expansum*. **Postharvest Biology and Technology**, v. 34, 1, p. 11-20, 2004.

CUNHA, T. **Potencial de leveduras isoladas do solo e do filoplano de plantas cítricas no biocontrole de doenças de pós-colheita de citros**. 2013. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2013.

CUQ, B.; GONTARD, N.; GUILBERT, S. Edible films and coatings as active layers. **Active Food Packaging**, M. Rooney (Ed.), p. 111-142, 1995.

DE BRITO, C.H.; PEREIRA DA COSTA, N.; DE LUNA BATISTA, J.; CORDEIRO DO NASCIMENTO, L.; DONATO DE OLIVEIRA, H.; SOARES BARRETO, E. Termoterapia para o controle de patógenos em pós-colheita em frutos da cajazeira. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 30, n. 1, 2008.

D'HALLEWIN, G.; ARRAS, G.; DESSI, R.; DETTORI, A.; SCHIRRA, M. *Citrus* green mould control in stored 'Star Ruby' grapefruit by the use of a bio-control yeast under curing conditions. **Acta Horticulture**, v. 495, p.111–115, 1998.

DROBY, S.; WISNIEWSKI, M.; MACARISIN, D.; WILSON, C. Twenty years of postharvest biocontrol research: Is it time for a new paradigm? **Postharvest Biology and Technology**, v. 52, p.137–145, 2009.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY – EFSA. Reasoned opinion on the modification of the existing MRL for guazatine in citrus fruits. **EFSA Journal**. v.12 (8), p. 3818-3847, 2014.

EL GHAOUTH, A.; SMILANICK, J.L.; BROWN, G.E.; IPPOLITO, A.; WISNIEWSKI, M. WILSON, C.L. Applications of *Candida saitoana* and glycolchitosan for the control of postharvest diseases of apple and citrus fruit under semicommercial conditions. **Plant Disease**, v. 84, p.243–248, 2000.

FELIZIANI, E.; ROMANAZZI, G. Preharvest application of synthetic fungicides and alternative treatments to control postharvest decay of fruit. **Stewart Postharvest Review**, 9, 3, p. 1-6, 2013.

FENG, L.; WU, F.; LI, J.; JIANG, Y.; DUAN, X. Antifungal activities of *Polyhexamethylene biguanide* and *Polyhexamethylene guanide* against the citrus sour rot pathogen *Geotrichum citri-aurantii* *in vitro* and *in vivo*. **Postharvest Biology and Technology**, v. 61, n. 2-3, p. 160–164, 2011.

FERRAZ, L.P. **Estudo dos mecanismos de ação de leveduras envolvidos no biocontrole de doenças de pós-colheita em citros**. 2014. 91 p. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2014.

FERRAZ, L.P.; CUNHA, T.; SILVA, A.L.; KUPPER, K.C. Biocontrol ability and putative mode of action of yeasts against *Geotrichum citri-aurantii* in citrus fruit. **Microbiological Research**, 188, 72-79, 2016.

FILONOW, A.B. Role of competition for sugars by yeast in the biocontrol of gray mold of apple. **Biocontrol Science and Technology**, v. 8, n. 2, p. 243-256, 1998.

FISCHER, I.H.; SPÓSITO, M.B.; LOURENÇO, S.A.; AMORIM, L. Eficiência dos fungicidas thiabendazole + imazalil, aplicados previamente ou em mistura à cera, no controle do bolor verde em citros. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.16, p.22,204, 2004.

FISCHER, I.H.; LOURENÇO DA SILVA, B.; SOARES, A.R.; DE ARRUDA, M.C.; CAGNIN MARTINS PARISI, M.; AMORIM, L. Efeito de fungicidas e produtos alternativos no controle da antracnose e da pinta preta da goiaba. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 1, 2012.

FORNER, C.; BETTIOL, W.; DO NASCIMENTO, L.M.; TERAPO, D. Controle em pós-colheita de *Penicillium digitatum* em laranja-pera com microrganismos e tratamento térmico. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35,1, p. 23-31, 2013.

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**, Jaboticabal, v. 24, n. 2, p. 569-572, 2002.

FRANÇA, S.C. **Comunidades de fungos micorrízicos arbusculares nos manejos convencional e orgânico de citros e suas interações com *Phytophthora parasítica***. 2004. 106f. Tese (doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2004.

FREDDO, A.R.; MAZARO, S.M.; BRUN, E.J.; WAGNER-JR, A. A quitosana como fungistático no crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* Kuhn. **Ciência Rural** [online]. v. 44, p. 1-4, 2014.

FRIGHETTO, R.T.S.; MELO, I.S. de. Produção de antibióticos por microrganismos. In: MELO, I.S. de.; SANHUEZA, R.M.V. (Coord.). **Métodos de seleção de microrganismos antagonísticos a fitopatógenos**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 1995. p. 40-46. (Manual Técnico).

FUJIMOTO, A.; KUPPER, K.C. Caracterização molecular de bactérias com atividade inibitória ao fungo causador da mancha preta dos citros. **Ciência e Tecnologia**. 8, esp. 2016.

FUNDECITRUS - Fundo de Defesa da Citricultura, et al. **Inventário de árvores do cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo/Sudoeste Mineiro: retrato dos pomares em março de 2017**. Fundecitrus, 95 p. 2017.

GARCIA, A.; et al. **Fungicidas I: utilização no controle químico de doenças e sua ação contra os fitopatógenos (Documentos 46)**. EMBRAPA-CPAF Rondônia, 32p., 1999.

GHINI, R.; BETTIOL, W. Diagnose. In: KIMATI, H. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. Controle cultural. 3 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v. 1, 39, p. 786-803.



GLIESSMAN, S.R. **Agroecologia**: processos ecológicos em agricultura sustentável. Porto Alegre: UFRGS, 2001.

GOLAN, R.B.; PHILLIPS, D.J. Postharvest heat treatment of fresh fruits and vegetables for decay control. **Plant Disease**, v. 75, p.1085-1089, 1991.

GRIGOLETTI JÚNIOR, A.; SANTOS, Á.F. dos; AUER, C.G. **Perspectivas do uso do controle biológico contra doenças florestais**, Curitiba, v. 30, n. 12, 2000.

HAO, W.; ZHONG, G.; HU, M., LUO, J.; WENG, Q.; RIZWANUL-HAQ, M. Control of citrus postharvest green and blue mold and sour rot by tea saponin combined with imazalil and prochloraz. **Postharvest Biology and Technology**, v.56, p. 39–43, 2010.

IPPOLITO, A., EL GHAOUTH, A., WILSON, C.L., WISNIEWSKI, M. Control of postharvest decay of apple fruit by *Aureobasidium pullulans* and induction of defense responses. **Postharvest Biology and Technology**, v.19, p.265–272, 2000.

IPPOLITO, A.; NIGRO, F.; SCHENA, L. Control of postharvest diseases of fresh fruits and vegetables by preharvest application of antagonistic microorganisms. **Crop management and postharvest handling of horticultural products**, v. 4, p. 1-30, 2004.

ISMAIL, M.; ZHANG, J. Post-harvest citrus diseases and their control. **Outlooks on Pest Management**, v. 15, p. 29–35, 2004.

JOHNSON, G.I.; HEATHER, N.W. Postharvest disease and pest control in tropical fruit. In: CHAMP, B. R.; HIGHLEY, E. (Ed.). **Postharvest technology for agricultural products in Vietnam**. Canberra: ACIAR, p. 100-126, 1995.

JUNQUEIRA, N.T.V. Manejo integrado de doenças do maracujazeiro, mangueira e goiabeira. In: ZAMBOLIM, L. (Org.). **Manejo integrado: fruteiras tropicais – doenças e pragas**. Viçosa, MG: UFV, v.1. p.239-277, 2002.

KELLERMAN, M.; et al. Postharvest dip, drench and wax coating application of pyrimethanil on citrus fruit: Residue loading and green mould control. **Crop Protection**, v. 103, p. 115-129, 2018.

KINAY, P.; YILDIZ, M.; YILDIZ, F.; DELEN, N.; TOSUN, N. Control of postharvest *Penicillium* decay of citrus fruits with antagonistic yeasts and chemical fungicides. **Acta Hort.**, v. 553, p. 383–388, 2001.

KINAY, P.; MANSOUR, M.F.; GABLER, F. M.; MARGOSAN, D. A.; SMILANICK, J. L. Characterization of fungicide-resistant isolates of *Penicillium digitatum* collected in California. **Crop Protection**, v. 26, p. 647–656, 2007.

KLEIN, M.N.; SILVA, A.C.; KUPPER, K.C. *Bacillus subtilis* based-formulation for the control of postbloom fruit drop of citrus. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 32, 12, p. 205, 2016.

KLEIN, M.N.; KUPPER, K.C. Biofilm production by *Aureobasidium pullulans* improves biocontrol against sour rot in citrus. **Food Microbiology** (2017),doi: 10.1016/j.fm.2017.07.008

KORSTEN, L.; TAVERNER, P. Citrus. In: REES, D., FARRELL, G., ORCHARD, J. (EDS.), **Crop Post-Harvest: Science and Technology**, v.5, p. 43-79, 2009.

KUMAR, M.N.R. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and functional polymers**, v. 46, n. 1, p. 1-27, 2000.

KUPPER, K.C.; CORRÊA, F.E.; DE AZEVEDO, F.A.; SILVA, A.C. *Bacillus subtilis* to biological control of postbloom fruit drop caused by *Colletotrichum acutatum* under field conditions. **Scientia horticultrae**. v. 134, p. 139-143, 2012.

LACHANCE, M.A.; STARMER, W.T. Ecology and Yeasts. In: KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. **The Yeasts, a Taxonomy Study**, 4th Edition.: Elsevier, 1998, p. 21-30.

LEVERENTZ, B.; JANISIEWICZ, W.J.; CONWAY, W.S.; SAFTNER, R.A.; FUCHS, Y.; SAMS, C.E.; CAMP, M.J. Combining yeasts or a bacterial biocontrol agent and heat treatment to reduce postharvest decay of 'Gala' apples. **Postharvest Biol. Technol.**, v. 12, p. 87–94., 2000.

LEWIS, J.A.; PAPAVIDAS, G.C. Biocontrol of plant diseases: the approach for tomorrow. **Crop protection**, v. 10, n. 2, p. 95-105, 1991.

LIMA, G.; IPPOLITO, A.; NIGRO, F.; SALERNO, F.; Effectiveness of *Aureobasidium pullulans* and *Candida oleophila* against postharvest strawberry rots. **Postharvest Biology and Technology**, v. 10, p. 169–178,1997.

LIMA, G.; ARRU, S.; DE CURTIS, F.; ARRAS G. Influence of antagonist, host fruit and pathogen on the biological control of postharvest fungal diseases by yeasts. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 23, n. 3, p. 223-229, 1999.

LIMA, J.R.; GONÇALVES, L.R.B.; BRANDÃO, L.R.; ROSA, C.A.; VIANA, F.M.P. Isolation, identification, and activity in vitro of killer yeasts against *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from tropical fruits. **Journal of Basic Microbiology**, v. 53, 7, p. 590-599, 2013.

LIMA, G.; SANZANI, S.M.; DE CURTIS, F.; IPPOLITO, A. Biological control of postharvest diseases. **Adv. Postharvest Fruit Veg. Technol**, 65, 2015.

LIU, X.; WANG, L.P.; LI, Y.C.; LI, H.Y.; YU, T.; ZHENG, X.D. Antifungal activity of thyme oil against *Geotrichum citri-aurantii* in vitro and in vivo. **Journal Applied of Microbiology**, v.107, p.1450–1456, 2009.

LIU, J.; SUI, Y.; WISNIEWSKI, M.; DROBY, S.; LIU, Y.; Review: utilization of antagonistic yeasts to manage postharvest fungal diseases of fruit. **International Journal of Food Microbiology**, v. 167, p. 153–160, 2013.

LIU, J.; SUI, Y.; WISNIEWSKI, M.; XIE, Z.; LIU, Y.; YOU, Y.; ZHANG, X.; SUN, Z.; LI, W.; LI, Y.; WANG, Q.The impact of the postharvest environment on the viability and

virulence of decay fungi. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 2017. DOI:10.1080/10408398.2017.1279122.

LOPES, J.M.S; DÉO, T.F.G; ANDRADE, B.J.M; GIROTO, M.; FELIPE, A.L.S.; JUNIOR, C.E.I.; BUENO, C.E.M.S.; SILVA, T.F.; LIMA, F.C.C. Importância econômica do Citros no Brasil. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, v.20, 2011. Disponível em:< <http://faef.revista.inf.br>>.

LOPES, M.R.; KLEIN M.N.; FERRAZ, L.P.; SILVA, A.C.; KUPPER, K.C. *Saccharomyces cerevisiae*: a novel and efficient biological control agent for *Colletotrichum acutatum* during pre-harvest. **Microbiological Research**, v. 175, p. 93–99, 2015.

McKAY, A.H.; FOSTER, H.; ADASKAVEG, J. Efficacy and application strategies for propiconazole as a new postharvest fungicide for managing sour rot and green mold of citrus fruit. **Plant Disease**, v. 96, p. 235-242, 2012.

MILLER, M.W. Yeasts in food spoilage: an update. **Food Technology**, v.33, p.76-80, 1979.

MIRANI, Y.A.; ALEMÁN, A.; CALVO, M.M.; CABALLERO, M.E.L.; MONTERO, P.; GUILLÉ, C.G. Antimicrobial and antioxidant chitosan solutions enriched with active shrimp (*Litopenaeus vannamei*) waste materials. **Food Hydroc.** v. 35. p. 710 e 717, 2014.

MENDÉZ, S.V.; MONDINO, P. Control biológico postcosecha en Uruguay. **Horticultura Internacional**, v. 7, n. 26, p. 29-36, 1999.

MORETTO, C.; CERVANTES, A.L.L.; BATISTA FILHO, A.; KUPPER, K.C. Integrated control of green mold to reduce chemical treatment in post-harvest citrus fruits. **Scientia Horticulturae**, v. 165, p. 433-438, 2014.

MOURA, V.S. **Caracterização bioquímica e funcional de toxina killer produzida por *Saccharomyces cerevisiae***. 2017. 34 p. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017.

NAFUSSI, B.; BEN-YEHOSHUA, S.; RODOV, V.; PERETZ, J.; OZER, B.K.; D'HALLEWIN, G. Mode of action of hot-water dip in reducing decay of lemon fruit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 49,1, p. 107-113, 2001.

NASCIMENTO, L.M.; SANTOS, P.C. Controle de doenças fúngicas e de danos por frio em pós-colheita de lima ácida Tahiti. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 80, p. 193-205, 2013. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/109677>>.

NEGREIROS, R.J.Z.; SALOMÃO, L.C.C.; PEREIRA, O.L.; CECON, P.R.; SIQUEIRA, D.M. Controle da antracnose na pós-colheita de bananas-'prata' com produtos alternativos aos agrotóxicos convencionais. **Revista Brasileira de Fruticultura [online]**. v. 35, p. 51-58, 2013.

NEVES, M.F.; TROMBIN, V.G.; MILAN, P.; LOPES, F.F.; PEREIRA, F.C.; KALAKI, R.B. **O retrato da citricultura brasileira**. Editora Marcos Fava Neves. 137p., 2010.

NUÑES, C.; USALL, J.; TEIXIDÓ, N.; TORRES, R.; VIÑAS, I. Control of *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* on apples and pears with the combination of *Candida sake* (CPA-1) and *Pantoea agglomerans* (CPA-2). **Journal of Food Protection**, v. 65, p. 178-184, 2002.

OLIVEIRA JUNIOR, E.N.; EL GUEDDARI, N.E.; MOERSCHBACHER, B.M.; FRANCO, B.M. Growth rate inhibition of phytopathogenic fungi by characterized chitosans. **Brazilian Journal of Microbiology** v. 43, p. 800-809, 2012.

OLIVEIRA, S.M.A.; DANTAS, S.A.F.; GURGEL, L.M.S. Indução de resistência em doenças pós-colheita em frutas e hortaliças. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 12, p. 343-371, 2004.

OLIVEIRA, R.P.; UENO, B.; CANTILLANO, R.F.F.; MATTOS, M.L.T.; MORENO, M.B. **Podridão azeda em Citros – Documento 418**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado. 30p. 2016.

ORTOLANI, A.A.; CAMARGO, M.B.P. Influência dos fatores climáticos na produção. In: CASTRO, P.R.C.; FERREIRA, S.O.; YAMADA, T. (Ed.). **Ecofisiologia da produção agrícola**, Piracicaba: Potafos, p.71-79, 1987.

PALOU, L.; SMILANICK, J.L.; DROBY, S. Alternatives to conventional fungicides for the control of citrus postharvest green and blue moulds. **Stewart Postharvest Review** v. 2, p.1-17, 2008.

PALOU, L.; SMILANICK, J.L.; CRISOSTO, C.H. Evaluation of food additives as alternative or complementary chemicals to conventional fungicides for the control of major postharvest diseases of stone fruit. **Journal of food protection**, v. 72, n. 5, p. 1037-1046, 2009.

PAULA JUNIOR, T.J.; MORANDI, A.B.; VEZON, M. Manejo Integrado de Doenças e Pagras utilizando o controle biológico. IN: DE ALMEIDA HALFELD-VIEIRA, Bernardo et al. **Defensivos Agrícolas Naturais: uso e perspectivas**. Brasília, DF: Embrapa, 2016. E-book no formato PDF

PEDRAZZOLI, D.S.; HERRMANN, G.R. Análise do mercado de defensivos agrícolas naturais. IN: DE ALMEIDA HALFELD-VIEIRA, Bernardo et al. **Defensivos Agrícolas Naturais: uso e perspectivas**. Brasília, DF: Embrapa, 2016. E-book no formato PDF.

PEÑA, G.D.; COSTALES, D.; FALCON, A.B. Influencia de un polímero de quitosana en el crecimiento y la actividad de enzimas defensivas en tomate (*Solanum lycopersicum* L.). **Cultrop** [online]. v. 35, p. 35-42, 2014.

PIO, R.M.; FIGUEIREDO, J.O.; STUCHI, E.S.; CARDOSO, S.A.B. Variedades copas. In: MATTOS JR., D.; DE NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JR., J. (Ed.). **Citros**. Campinas: IAC e Fundag, p.37-60. 2005.

PLAZA P.; USALL, J.; TEIXIDÓ, N.; VIÑAS, I. Effect of water activity and temperature on competing abilities of common postharvest citrus fungi. **International Journal of Food Microbiology**, v. 90, p. 75-82, 2004.

PLUMBRIDGE, J. Regulation of carbon assimilation in bacteria. In: LEDERBERG J (Ed.) **Encyclopedia of Microbiology**. Academic, p. 375-394, 2009.

REED, J.B.; HENDRIX, JR., C.M.; HENDRIX, D.L. **Quality control manual for citrus processing plants**. Book I, Intercit Inc. Safety Harbor, Fla., 1986. 250p

REES, D.; FARRELL, G.; ORCHARD, J. **Crop Post-Harvest: Science and Technology**, Perishables. John Wiley & Sons, 480 pp, 2012.

ROMANAZZI, G.; FELIZIANI, E.; BAÑOS, S.B.; SIVAKUMAR, D. Shelf Life Extension of Fresh Fruit and Vegetables by Chitosan Treatment, **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 2015. DOI:10.1080/10408398.2014.900474

SAVASTANO, G.; FAWCETT, H. S. A study of decay in citrus fruits produced by inoculations with known mixtures of fungi at different constant temperatures. **Journal of Agriculture Research**, v. 39, p. 163-198, 1929.

SENHOR, R.F.; DE SOUZA, P.A.; ANDRADE NETO, R.C., MARACAJÁ, P.B.; NASCIMENTO, F.J. Manejo de doenças pós-colheita. **Revista Verde de agroecologia e desenvolvimento sustentável**, v.4, 1, p. 01-13, 2009.

SHANER, G.; FINNEY, R.E. The effects of nitrogen fertilization on the expression of slowmildwing in knox wheat. **Phytopathology**. 67, 1051-1055, 1977.

SHARMA, N.; VERMA, U.; AWASTHI, P. A combination of the yeast *Candida utilis* and chitosan controls fruit rot in tomato caused by *Alternaria alternata* (Fr. Keissler) and *Geotrichum candidum* Link ex Pers. **J Hortic Sci Biotechnol**, v. 81, p. 1052–1056, 2006.

SILVA, H.S.R; DOS SANTOS, K.S.C.R; FERREIRA, E.I. Chitosan: hydrossoluble derivatives, pharmaceutical applications and recent advances. **Quimica Nova**, v. 29, n. 4, p. 776-785, 2006.

SILVA, V.N.; et al. Growth promotion and resistance induction against anthracnose in cucumber using *Trichoderma* spp. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 12, p. 1609-1618, 2011.

SMILANICK, J.L.; SORENSON, D.; MANSOUR, M.; AIEYABEI, J.; PLAZA, P. Impact of a brief postharvest hot water drench treatment on decay, fruit appearance, and microbe populations of California lemons and oranges. **Hort Technology**, 13, 2, p. 333-338, 2003.

SOUZA, C.D.; FILIPPO, D.; FARIA, L.I.L.; SANZ-CASADO, E. Estudo bibliométrico da produção científica do setor citrícola no Brasil: Análise de publicações na Web of Science (2000-2010). **Liinc em Revista**, Rio de Janeiro, v. 9, n. 1, p. 28-46, 2013.

SPADARO, D.; GULLINO, M.L. State of the art and future prospects of the biological control of postharvest fruit diseases. **International Journal of Food Microbiology**, v. 91, p.185–194, 2004.

SPONHOLZ, C.; BATISTA, U.G.; ZAMBOLIM, L.; SALOMÃO, L.C., CARDOSO, A.A. Efeito do tratamento hidrotérmico e químico de frutos de banana 'Prata' no controle da antracnose em pós-colheita. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 5, p. 480-485, 2004.

SUPRAPTA, D. N.; ARAI, K.; IWAI, H. Distribution of *Geotrichum candidum* citrus race in citrus groves and non-citrus fields in Japan. **Mycoscience**, v. 36, n. 3, p. 277-282, 1995.

SWINGLE, W.T. The botany of citrus and its wild relatives of the orange subfamily. In: Weber, H.J., Batchellor, L.D. (Ed.) **The citrus industry**, v., 1, p. 129-474, 1943.

TALIBI, I.; ASKARNE, L.; BOUBAKER, H.; BOUDYACH, E.H.; MSANDA, F.; SAAID, B.; AIT BEN AOUMAR, A. Antifungal activity of some Moroccan plants against *Geotrichum candidum*, the causal agent of postharvest citrus sour rot. **Crop Protection**, v. 35, p. 41-46, 2012.

TOFFANO, L. Efeito dos extratos do albedo de *Citrus sinensis*, *Lentinula edodes*, *Agaricus blazei* e dos compostos orgânicos voláteis produzidos por *Saccharomyces cerevisiae* no controle da mancha preta dos citros. In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 28, 2005, São Paulo. In: **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 31, p. 16-16, 2005.

TOURNAS, V. H. Spoilage of vegetable crops by bacteria and fungi and related health hazards. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 31, n. 1, p. 33–44, 2005.

USALL, J.; TEIXIDÓ, N.; TORRES, R.; OCHOA DE ERIBE, X.; VINAS, I. Pilot tests of Candida sake (CPA-1) applications to control postharvest blue mold on apple fruit. **Postharvest Biol. Technol.**, v. 21, p. 147–156, 2001.

VERO, S.; MONDINO, P.; BURGUEÑO, J.; SOUBES, M.; WISNIEWSKI, M. Characterization of biocontrol activity of two yeast strains from Uruguay against blue mold of apple. **Postharvest Biology and Technology**, v. 26, n. 1, p. 91-98, 2002.

VERO, S.; GARMENDIA, G.; GONZÁLEZ, M. B.; GARAT, M. F.; WISNIEWSKI, M. *Aureobasidium pullulans* as a biocontrol agent of postharvest pathogens of apples in Uruguay. **Biocontrol Science and Technology**, v. 19, n. 10, p. 1033- 1049, 2009.

VERO, S.; GARMENDIA, G.; SANGORRIN, M.; VARGAS, M. Controle biológico de doenças em pós-colheita. IN: DE ALMEIDA HALFELD-VIEIRA, Bernardo et al. **Defensivos Agrícolas Naturais: uso e perspectivas**. Brasília, DF: Embrapa, 2016. E-book no formato PDF

WILSON, C.L.; WISNIEWSKI, M.E.; DROBY, S.; CHALUTZ, E. A selection strategy for microbial antagonists to control postharvest diseases of fruits and vegetables. **Scientia Horticulturae**, v. 53, p. 183-189, 1993.

WISNIEWSKI, M.; BILES, C.; DROBY, S.; MCLAUGHLIN, R.; WILSON, C.; CHALUTZ, E. Mode of action of the postharvest biocontrol yeast, *Pichia guilliermondii*. I. Characterization of attachment to *Botrytis cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v. 39, p. 245-258, 1991.

WEZEL, A.; BELLON, S.; DORÉ, T.; FRANCIS, C.; VALLOD, D.; DAVID, C. Agroecology as a science, a movement and a practice. A review. ***Agronomy for Sustainable Development***, v. 29, n. 4, p. 503-515, 2009.

YANG, C.; HAMEL, C.; VUJANOVIC, V.; GAN, Y. Fungicide: modes of action and possible impact on nontarget microorganisms. ***ISRN Ecology***, v. 2011, 2011.

ZAMBOLIM, L.; RIBEIRO DO VALE, F.X.; MONTEIRO, A.J.A.; COSTA, H. **Controle de doenças de plantas frutíferas**, Viçosa, v.2, p. 141-214, 2002.

ZHIMO, V.Y.; BHUTIA, D.D.; SAHA, J. Biological control of post harvest fruit diseases using antagonistic yeasts in India. ***Journal of Plant Pathology***, p. 275-283, 2016.

ZHOU, H.; TAO, N.; JIA, L. Interactions between *Pseudomonas syringae* MA-4 and cyprodinil in the control of blue mold and gray mold of apple. ***Can. J. Plant Pathol.***, v.24, p. 154-161, 2002.

ZULIAN, A.; DÖRR, A.C.; ALMEIDA, S.C. Citricultura e agronegócio cooperativo no Brasil. ***Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnológica Ambiental***. V. 11, p. 2290-2306, 2013.