



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS**

**ÓLEOS ESSENCIAIS DE TANGERINAS PARA MANEJO DE PODRIDÃO FLORAL  
DOS CITROS (*Colletotrichum abscissum*)**

**Eng.(a) Agr.(a) ANDREZA BONETTO ZUNKELLER**

**Araras**

**2024**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM**  
**PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS**

**ÓLEOS ESSENCIAIS DE TANGERINAS PARA MANEJO DE PODRIDÃO FLORAL**  
**DOS CITROS (*Colletotrichum abscissum*)**

**Eng.(a) Agr.(a) ANDREZA BONETTO ZUNKELLER**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. EVANDRO HENRIQUE SCHINOR**

**CO-ORIENTADORA: Dra. MARINÊS BASTIANEL**

Dissertação apresentada ao Programa  
de Pós-Graduação em Produção  
Vegetal e Bioprocessos Associados  
como requisito parcial à obtenção do  
título de MESTRE EM PRODUÇÃO  
VEGETAL E BIOPROCESSOS  
ASSOCIADOS

Araras

2024

Zunkeller, Andreza Bonetto

Óleos essenciais de tangerinas para manejo de podridão floral dos citros (*Colletotrichum abscissum*) / Andreza Bonetto Zunkeller -- 2024.  
81f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, campus Araras, Araras  
Orientador (a): Evandro Henrique Schinor  
Banca Examinadora: Fernando Alves de Azevedo,  
Mariângela Cristofani-Yaly  
Bibliografia

1. Citricultura. 2. Compostos voláteis. 3. Controle alternativo. I. Zunkeller, Andreza Bonetto. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática  
(SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Maria Helena Sachi do Amaral - CRB/8  
7083



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
Centro de Ciências Agrárias  
Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados

---

### **Folha de Aprovação**

---

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Andreza Bonetto Zunkeller, realizada em 06/11/2024.

#### **Comissão Julgadora:**

Prof. Dr. Evandro Henrique Schinor (UFSCar)

Prof. Dr. Fernando Alves de Azevedo (IAC)

Profa. Dra. Mariângela Cristofani-Yaly (IAC)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Universidade Federal de São Carlos pelo espaço e pela estrutura concedida ao longo de toda minha pós-graduação.

Aos meus colegas do Laboratório de Nematologia, pela amizade, pelas trocas de conhecimento, apoio e dedicação.

Ao meu orientador Prof. Dr. Evandro Henrique Schinor e minha coorientadora Dra. Marinês Bastianel, pela oportunidade, apoio e seus ensinamentos para a realização deste trabalho e a todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados, pela dedicação, empenho e conhecimentos transmitidos.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento e Pesquisa do Ensino Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo. Código de Financiamento 001

Ao Instituto Agrônomo de Campinas - Centro de Citricultura Sylvio Moreira por todo suporte durante o experimento.

Às alunas de iniciação científica, Geovana Marzochi e Maria Clara Chingnolli, que me auxiliaram no desenvolvimento dos experimentos.

À minha família, Silvia, Ivan e Amanda que sempre me apoiaram, e que são pessoas indispensáveis para que eu possa concluir essa etapa da minha vida.

À minha amiga Beatriz e meu noivo Lucas, por me apoiar e me ajudar nos momentos difíceis.

À minha colega de casa, Carina, pelo acolhimento e amizade nessa etapa.

A todos que contribuíram de forma direta ou indireta, sinto-me eternamente grata por toda experiência transmitida.

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>3</b>
<b>SUMÁRIO</b> .....	<b>6</b>
<b>ÍNDICE DE TABELAS</b> .....	<b>i</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>ii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>5</b>
2.1. Objetivo geral .....	5
2.2. Objetivos específicos.....	5
<b>3. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>6</b>
3.1. Cenário atual da citricultura brasileira .....	6
3.2. Óleos essenciais e atividade antimicrobiana .....	7
3.3. Podridão floral dos citros .....	11
3.4. Indução de resistência em plantas .....	15
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>18</b>
4.1. Local do experimento .....	18
4.2. Isolamento e preparo do fungo <i>Colletotrichum abscissum</i> .....	18
4.2.1. Análise morfológica do <i>C. abscissum</i> .....	18
4.3. Seleção e preparo dos frutos de tangerinas.....	19
4.3.1. Espessura da casca e diâmetro dos frutos .....	19
4.3.2. Extração dos óleos essenciais de tangerinas .....	20
4.4. Análise cromatográfica dos óleos essenciais .....	20
4.5. Efeito dos óleos essenciais sobre <i>C. abscissum in vitro</i> : .....	21
4.5.1. Germinação de esporos do <i>C. abscissum</i> .....	23
4.6. Óleos essenciais no controle da PFC em flores destacadas.....	24
4.7. Avaliação da indução dos mecanismos de defesa das plantas pelos óleos essenciais .....	25
4.7.1. Análises bioquímicas: .....	25
4.8. Análise estatística.....	26
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>26</b>
5.1. Análise morfológica do <i>C. abscissum</i> .....	26
5.2. Espessura da casca, diâmetro dos frutos e rendimento dos OEs .....	27
5.3. Composição dos óleos essenciais de tangerinas.....	31
5.4. Inibição <i>in vitro</i> do fungo <i>C. abscissum</i> .....	34
5.4.1. Germinação de conídios do <i>C. abscissum</i> .....	45
5.5. Controle da PFC em flores destacadas.....	49

5.6. Óleo essencial na indução de mecanismos de defesa em plantas de laranja Valência .....	50
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>52</b>
<b>7. LITERATURA CITADA .....</b>	<b>53</b>

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Diâmetro e espessura da casca (epicarpo, mesocarpo e total) de frutos imaturos (I) e maduros (M) de tangerinas enxertadas em limão Cravo. ....	28
<b>Tabela 2.</b> Matriz de correlação de Pearson entre rendimento de óleo essencial e espessura de casca das tangerinas enxertadas em limão Cravo. ....	30
<b>Tabela 3.</b> Composição química e porcentagem relativa de óleos essenciais de cascas de frutos imaturos (I) e maduros (M) de tangerinas enxertadas em limão Cravo. ....	32
<b>Tabela 4.</b> Índice de velocidade e área abaixo da curva do crescimento micelial do <i>C. abscissum</i> , <i>in vitro</i> , sob diferentes doses (0, 2, 4, 8, 16 e 32 ( $\mu\text{L mL}^{-1}$ ) de OEs de três variedades de tangerinas extraídos de frutos imaturos. ....	40
<b>Tabela 5.</b> Índice de velocidade e área abaixo da curva do crescimento micelial do <i>C. acutatum</i> , <i>in vitro</i> , sob diferentes doses (0, 2, 4, 8, 16 e 32 ( $\mu\text{L mL}^{-1}$ ) de OEs de três variedades de tangerinas extraídos de frutos maduros. ....	42
<b>Tabela 6.</b> Contagem de esporos ( $10^5$ ) por mL de suspensão de <i>C. abscissum</i> , <i>in vitro</i> , sob diferentes doses (0, 2, 4, 8, 16 e 32 ( $\mu\text{L mL}^{-1}$ ) de OEs de três variedades de tangerinas extraídos de frutos imaturos. ....	44
<b>Tabela 7.</b> Contagem de esporos ( $10^5$ ) por mL de suspensão de <i>C. acutatum</i> , <i>in vitro</i> , sob diferentes doses (0, 2, 4, 8, 16 e 32 ( $\mu\text{L mL}^{-1}$ ) de OEs de três variedades de tangerinas extraídos de frutos maduros. ....	44
<b>Tabela 8.</b> Porcentagem de esporos germinados de <i>C. abscissum</i> , <i>in vitro</i> , sob diferentes doses (0, 2, 4, 8, 16 e 32 ( $\mu\text{L mL}^{-1}$ ) de OEs de três variedades de tangerinas extraídos de frutos imaturos. ....	45
<b>Tabela 9.</b> Porcentagem de esporos germinados de <i>C. abscissum</i> , <i>in vitro</i> , sob diferentes doses (0, 2, 4, 8, 16 e 32 ( $\mu\text{L mL}^{-1}$ ) de OEs de três variedades de tangerinas extraídos de frutos maduros. ....	47
<b>Tabela 10.</b> Incidência da doença causada por <i>Colletotrichum abscissum</i> em flores destacadas de lima ácida Tahiti tratadas preventivamente com óleos essenciais de tangerinas na dosagem de 32 $\mu\text{L mL}^{-1}$ junto ao fungicida comercial e testemunha negativa. ....	49
<b>Tabela 11.</b> Atividade das enzimas peroxidase, polifenoloxidase e fenilalanina amônia-liase em folhas de laranja Valência tratadas com óleos essenciais de tangerinas na dosagem de 32 $\mu\text{L mL}^{-1}$ junto ao fungicida comercial e testemunha negativa. ....	51

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Sintomas da podridão floral dos citros causada pelo fungo *Colletotrichum abscissum*. A = Sintomas nas pétalas. B = Lesão necrótica no estigma. C = Amarelecimento e queda dos frutos. D = Cálice retido após queda prematura dos frutos. Fonte: autor ..... 12
- Figura 2.** Ciclo da podridão floral dos citros causada pelo fungo *Colletotrichum abscissum*. a = apressório; c = conídio; sc = conidiação secundária. Fonte: PERES, N. A. (2005) ..... 14
- Figura 3.** Variedades de tangerinas selecionadas para medições de espessura de casca, diâmetro dos frutos e extração de óleo essencial da casca. A) tangerina IAC 2019 Maria; (B) mexerica Late IAC 585 e (C) tangor Murcott IAC 221. Fonte: Germoplasma de citros (CAPTACSM) ..... 19
- Figura 4.** Extração de óleo essencial da casca de tangerinas. (A) e (B) Extração do óleo no destilador tipo Clevenger (SL-76/2000); (C) Produto final da destilação; (D) e (E) Cascas cortadas de frutos imaturos e maduros, respectivamente. Fonte: autor ..... 20
- Figura 5.** Demonstração da marcação para mensurar o crescimento micelial do fungo *Colletotrichum abscissum*. Fonte: autor ..... 22
- Figura 6.** Esquema de um hemacitômetro tipo Neubauer: compartimentos (A, B e C) e subcompartimentos (a, b e c) da lâmina. Fonte: Alfenas, Zauza e Mafia (2007). ..... 23
- Figura 7.** Inoculação das pétalas de flores destacadas de lima ácida Tahiti com suspensão de esporos de *Colletotrichum abscissum* em placas de Petri contendo meio àgar-àgua. .... 24
- Figura 8.** Crescimento micelial de *Colletotrichum abscissum* em meio batata-dextrose-àgar após 15 dias de cultivo. (A) Frente e (B) verso da placa de Petri. (C e D) Conídios - Escala = 20µm. Fonte: Autor. .... 27
- Figura 9.** Representação visual do diâmetro e espessura de casca dos frutos colhidos imaturos das variedades de tangerinas enxertadas em limão cravo ..... 28
- Figura 10.** Representação visual do diâmetro e espessura de casca dos frutos maduros das variedades de tangerinas enxertadas em limão Cravo. .... 29
- Figura 11.** Porcentagem de rendimento médio de óleo essencial de cascas de frutos imaturos e maduros de tangerinas enxertadas em limão Cravo. Médias seguidas de mesma letra (maiúsculas diferenciando entre variedades da mesma maturação e minúsculas diferenciando entre maturação dentro da mesma variedade) não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. .... 30
- Figura 12.** Análise de componentes principais (PCA) mostrando a distribuição de frutos de três variedades de tangerinas: tangor Murcott IAC 221 (Mu), mexerica Late IAC 585 (L) e tangerina IAC 2019Maria (Ma), em dois estágios: maduro (M) e imaturo (I) associados com as variáveis: rendimento de óleo essencial (rend), diâmetro de frutos (diam), espessura do epicarpo (epi), espessura do mesocarpo (meso) e espessura total da casca (esp). ..... 31
- Figura 13.** Porcentagem de inibição do crescimento micelial (PICM) de *C. abscissum*, *in vitro*, em diferentes doses (0, 2, 4, 8, 16 e 32 µL mL<sup>-1</sup>) de óleo essencial de casca de três variedades de tangerinas extraídos de frutos imaturo, junto ao fungicida comercial (trifloxistrobina (100 g L<sup>-1</sup>) + tebuconazol (200 g L<sup>-1</sup>)). Médias seguidas de mesma letra (maiúsculas diferenciando entre doses da mesma variedade e minúsculas diferenciando entre as variedades dentro da mesma dose) não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. “\*” = diferiu significativamente das demais. .... 35
- Figura 14.** Representação visual do crescimento micelial, *in vitro*, de *C. abscissum* sob diferentes doses (0, 2, 4, 8, 16 e 32 (µL mL<sup>-1</sup>) de OEs de tangerinas extraídos de frutos imaturos comparadas ao fungicida comercial (trifloxistrobina (100 g L<sup>-1</sup>) + tebuconazol (200 g L<sup>-1</sup>)). Fonte: autor ..... 36

- Figura 15.** Representação visual do crescimento micelial, *in vitro*, de *C. abscissum* sob diferentes doses (0, 2, 4, 8, 16 e 32 ( $\mu\text{L mL}^{-1}$ ) de OEs de tangerinas extraídos de frutos maduros comparadas ao fungicida comercial (trifloxistrobina ( $100 \text{ g L}^{-1}$ ) + tebuconazol ( $200 \text{ g L}^{-1}$ )) Fonte: autor ..... 37
- Figura 16.** Porcentagem de inibição do crescimento micelial (PICM) de *C. abscissum*, *in vitro*, em diferentes doses (0, 2, 4, 8, 16 e 32  $\mu\text{L mL}^{-1}$ ) de OE da casca de três variedades de tangerinas extraídos de frutos maduros, junto ao fungicida comercial (trifloxistrobina ( $100 \text{ g L}^{-1}$ ) + tebuconazol ( $200 \text{ g L}^{-1}$ )). Médias seguidas de mesma letra (maiúsculas diferenciando entre doses da mesma variedade e minúsculas diferenciando entre as variedades dentro da mesma dose) não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. “\*\*” = diferiu significativamente das demais ..... 38
- Figura 17.** Índice de velocidade e área abaixo da curva do crescimento micelial do *C. abscissum*, *in vitro*, sob diferentes doses (0, 2, 4, 8, 16 e 32 ( $\mu\text{L mL}^{-1}$ ) de OEs de três variedades de tangerinas extraídos de frutos imaturos. .... 39
- Figura 18.** Índice de velocidade e área abaixo da curva do crescimento micelial do *C. acutatum*, *in vitro*, sob diferentes doses (0, 2, 4, 8, 16 e 32 ( $\mu\text{L mL}^{-1}$ ) de OEs de três variedades de tangerinas extraídos de frutos maduros. .... 41
- Figura 19.** Contagem de esporos ( $10^5$ ) por mL de suspensão de *C. abscissum*, *in vitro*, sob diferentes doses (0, 2, 4, 8, 16 e 32 ( $\mu\text{L mL}^{-1}$ ) de OEs de três variedades de tangerinas extraídos de frutos imaturos..... 43
- Figura 20.** Contagem de esporos ( $10^5$ ) por mL de suspensão de *C. acutatum*, *in vitro*, sob diferentes doses (0, 2, 4, 8, 16 e 32 ( $\mu\text{L mL}^{-1}$ ) de OEs de três variedades de tangerinas extraídos de frutos maduros. .... 44
- Figura 21.** Porcentagem de esporos germinados de *C. abscissum*, *in vitro*, sob diferentes doses (0, 2, 4, 8, 16 e 32 ( $\mu\text{L mL}^{-1}$ ) de OEs de três variedades de tangerinas extraídos de frutos imaturos. .... 45
- Figura 22.** Porcentagem de esporos germinados de *C. abscissum*, *in vitro*, sob diferentes doses (0, 2, 4, 8, 16 e 32 ( $\mu\text{L mL}^{-1}$ ) de OEs de três variedades de tangerinas extraídos de frutos maduros..... 47
- Figura 23.** Análise de componentes principais (PCA) mostrando a distribuição dos óleos essenciais de frutos imaturos (I) e maduros (M) de três variedades de tangerinas: tangor Murcott IAC 221 (Mu), mexerica Late IAC 585 (L) e tangerina IAC 2019Maria (Ma), associados aos seus componentes químicos, crescimento micelial (cm), esporulação (espor) e germinação de conídios (germ) do *C. abscissum in vitro*. .... 48
- Figura 24.** Sintomas de podridão floral dos citros causada por *Colletotrichum abscissum* em flores destacadas de lima ácida Tahiti, tratadas com óleo essencial de tangerinas e mantidas em meio Ágar-água dois dias após a inoculação..... 50

## **ÓLEOS ESSENCIAIS DE TANGERINAS PARA MANEJO DE PODRIDÃO FLORAL DOS CITROS (*Colletotrichum abscissum*)**

**Autor: ANDREZA BONETTO ZUNKELLER**

**Orientador: Prof. Dr. EVANDRO HENRIQUE SCHINOR**

**Co-orientador: Dra. MARINÊS BASTIANEL**

### **RESUMO**

A citricultura no Brasil vem enfrentando problemas fitossanitários que acarretam perdas significativas da produção, dentre elas se destaca a podridão floral dos citros (PFC) causada pelo fungo *Colletotrichum abscissum*. Por meio deste trabalho, objetivou-se investigar a ação dos óleos essenciais (OEs) de tangerinas sobre o fungo *C. abscissum* para manejo da PFC. OEs de três variedades de tangerinas: IAC 2019Maria, tangor Murcott IAC 221 e mexerica Late IAC 585, extraídos de frutos imaturos e maduros em diferentes dosagens (0; 2; 4; 8; 16 e 32 ( $\mu\text{L mL}^{-1}$ )) foram avaliados quanto à porcentagem de inibição do crescimento micelial, índice de velocidade e área abaixo da curva de crescimento micelial, esporulação e germinação de esporos *in vitro* do fungo *C. abscissum*. Junto a isso, verificou-se os componentes químicos presentes nos OEs e o rendimento e sua relação ao diâmetro dos frutos e espessura de casca. Diante dos resultados encontrados *in vitro*, analisou-se a capacidade de controle da doença em flores destacadas de lima ácida Tahiti, além do potencial dos OEs em ativar os mecanismos de defesa nas plantas, pela ação da peroxidase, polifenoloxidase e fenilalanina amônia-liase. O limoneno foi o principal composto encontrado nos OEs das tangerinas extraídos de frutos imaturos e maduros. Observou-se que a mexerica Late IAC 585 apresentou maior rendimento de OE quando extraído de frutos imaturos. Houve uma correlação positiva entre rendimento e espessura do epicarpo da casca tanto para OEs de frutos imaturos como maduros. No teste *in vitro* com OEs extraídos de frutos imaturos a mexerica Late IAC 585 demonstrou maior capacidade de inibir o crescimento micelial e ao empregar o OE extraído dos frutos maduros, a tangerina IAC 2019Maria foi mais eficiente no controle do patógeno. Os OEs de ambas as variedades foram eficazes no controle da esporulação quando extraídos de frutos imaturos. Para frutos maduros houve

diferença apenas entre dosagens havendo uma queda acentuada no número de conídios com o aumento da dose. Quando utilizada as dosagens 16 e 32  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , os óleos essenciais das três variedades de tangerinas extraídos de frutos imaturos e maduros, controlaram a germinação de esporos se igualando a ação do fungicida. Quando aplicado em flores destacadas, os OEs não tiveram ação sistêmica nas flores para prevenir a infecção de *C. abscissum*, além de não apresentarem a capacidade de ativar os mecanismos de defesa da planta.

**Palavras-chave:** citricultura; efeito antifúngico; crescimento micelial; compostos voláteis; controle alternativo, *Citrus* spp.

## **TANGERINE ESSENTIAL OILS FOR MANAGEMENT OF POSTBLOOM FRUIT DROP (PFD) (*Colletotrichum abscissum*)**

**Author: ANDREZA BONETTO ZUNKELLER**

**Adviser: Prof. Dr. EVANDRO HENRIQUE SCHINOR**

**Co-adviser: Dra. MARINÊS BASTIANEL**

### **ABSTRACT**

Citrus farming in Brazil has been facing phytosanitary problems that lead to significant production losses, among which postbloom fruit drop (PFD) caused by the fungus *Colletotrichum abscissum* stands out. This study aimed to investigate the action of tangerine essential oils (EOs) on the fungus *C. abscissum* for the management of CBF. EOs of three tangerine varieties: IAC 2019Maria mandarin, Murcott IAC 221 tangor and Late IAC 585 willowleaf, extracted from unripe and ripe fruits at different dosages (0; 2; 4; 8; 16 and 32 ( $\mu\text{L mL}^{-1}$ ) were evaluated for the percentage of inhibition of mycelial growth, speed index and area under the mycelial growth curve, sporulation and germination of in vitro spores of the fungus *C. abscissum*. In addition, the chemical components present in the EOs and the yield and their relationship to the diameter of the fruits and peel thickness were verified. Given the results found in vitro, the disease control capacity in detached flowers of Tahiti acid lime was analyzed, in addition to the potential of the EOs to activate defense mechanisms in plants, by the action of peroxidase, polyphenol oxidase and phenylalanine ammonia-lyase. Limonene was the main compound found in the EOs of tangerines extracted from unripe and ripe fruits. It was observed that the Late IAC 585 willowleaf presented a higher EO yield when extracted from unripe fruits. There was a positive correlation between yield and epicarp thickness of the peel for both EOs from unripe and ripe fruits. In the in vitro test with EOs extracted from unripe fruits, the Late IAC 585 willowleaf demonstrated a greater capacity to inhibit mycelial growth and when using the EO extracted from ripe fruits, the IAC 2019Maria mandarin was more efficient in controlling the pathogen. The EOs of both varieties were effective in controlling sporulation when extracted from unripe fruits. For ripe fruits, there was a difference only between dosages, with a sharp decrease in the number of conidia with increasing dosage. The EO of the IAC 2019Maria mandarin stood out for presenting control of spore germination at lower

doses, when compared to the other varieties, for both unripe and ripe fruits. When applied to detached flowers, the EO had no systemic action on the flowers to prevent *C. abscissum* infection, in addition to not having the ability to activate the plant's defense mechanisms.

**Key-words:** citrus farming; antifungal effect; mycelial growth; volatile compounds; alternative control, Citrus spp.

## 1. INTRODUÇÃO

A citricultura no Brasil se destaca pelo crescimento socioeconômico e pela contribuição na balança comercial nacional. De acordo com o último dado publicado pela FAO (2024), em 2022 o Brasil se destacou como segundo maior produtor mundial de citros com uma produção de aproximadamente 20 milhões de toneladas, porém, líder mundial considerando apenas a produção de laranja, com cerca de 17 milhões de toneladas produzidas. O setor citrícola de São Paulo e Triângulo/Sudoeste de Minas Gerais movimentam cerca de US\$ 14 bilhões por ano, que adicionam R\$ 2 bilhões ao Produto Interno Bruto (PIB) brasileiro, somente com as exportações, além de ser responsável pelos 200 mil empregos diretos (CitrusBR, 2019).

Os citros são espécies vegetais que pertencem à família Rutaceae e principalmente aos gêneros *Citrus*, *Poncirus*, *Fortunella* e *Microcitrus* spp. Nacionalmente predomina-se o cultivo de laranjas doces destinadas ao processamento de suco e para mercado de frutas frescas. Além das laranjas, a cultura se baseia em limas doces, limões, limas ácidas, pomelos e tangerinas (GIRARDI *et al.*, 2021).

Produtores vêm adotando melhores práticas agrícolas a fim de garantir a máxima produção, para isso, o controle de pragas e doenças se torna fundamental. Dentre as doenças, a podridão floral dos citros (PFC) ou queda prematura dos frutos cítricos (QPFC) é de extrema importância, podendo reduzir em mais de 80% a produção (GOES *et al.*, 2008). Essa doença tem como agente causal espécies do complexo *Colletotrichum acutatum* e *C. gloesporioides*, porém no Estado de São Paulo, independentemente da região e do cultivo da laranja doce, estima-se que *C. abscissum*, pertencente ao complexo de *C. acutatum* seja responsável por mais de 80% da incidência da doença (GONÇALVES *et al.*, 2021). A infecção pelo fungo causa sintomas evidentes e iniciais nas flores abertas afetando praticamente todas as variedades, principalmente flores de laranjeiras que são as mais suscetíveis (SILVA JUNIOR, 2019).

Inicialmente, as flores infectadas apresentam lesões alaranjadas ou de coloração marrom, podendo ocorrer antes mesmo da abertura floral, provocando um crestamento (TIMMER *et al.*, 1994). Já nos frutos recém formados ocorre um amarelecimento e queda precoce, permanecendo retidos à planta apenas cálices e pedúnculos, os quais se parecem com uma “estrelinha”. Esse fenômeno compromete

não apenas a produção atual como também afeta a florada seguinte por permanecerem aderidas aos ramos por até 18 meses (FEICHTENBERGER, 1991).

Estima-se que 5 a 6 frutos sejam perdidos para cada 100 botões formados, resultantes de infecções pelo fungo causal da PFC (TIMMER; ZITKO, 1995). Em condições de alta umidade e períodos prolongados de chuva, favorecem o desenvolvimento e disseminação do fungo e as perdas de produção podem chegar em até 100% (TIMMER, 1993; GOES *et al.*, 2008).

O uso de fungicidas químicos é a principal abordagem no controle da doença, porém, além da sua significativa contribuição para a produção agrícola, o uso indiscriminado pode contribuir para a ocorrência de resistência de linhagens fúngicas, representando também alto risco de impacto ambiental pela sua toxicidade e danos à saúde humana (BEBBER; GURR, 2015). É importante ressaltar que já existem relatos de *C. acutatum*, isolados de morango, resistentes à estrobirulina, grupo pertencente aos fungicidas inibidores externos da quinona (QoI) (FORCELINI *et al.*, 2016).

Torna-se necessário então, a busca por produtos alternativos sustentáveis, a fim de evitar esses riscos mantendo sua eficiência de controle. Estudos com óleos essenciais (OEs) vem crescendo nos últimos anos pelo seu importante papel na proteção das plantas, além de não apresentarem toxicidade e não haver a contaminação de solo e água causando danos ao meio biótico (DE SOUZA *et al.*, 2019). O metabolismo secundário dos vegetais produz naturalmente compostos voláteis como monoterpenos, diterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides, constituintes dos OEs. Em função da sua composição química e dos compostos aromáticos voláteis, possuem atividade antifúngica tanto direta, pela inibição da germinação de esporos e do crescimento micelial como também indireta, produzindo compostos de defesa da planta (DE MORAIS, 2009). Tang *et al.*, (2020) documentaram que OEs são capazes de tornar a membrana celular do fungo permeável, causando o vazamento de seu conteúdo, devido à presença de determinados terpenos. Há uma interação entre óleo e os lipídeos da membrana celular, interferindo nessa permeabilidade e causando alterações na estrutura do patógeno (COSTA *et al.*, 2011). Já na ação indireta, as moléculas presentes nos OEs podem induzir mecanismos de defesa nas plantas tratadas. Tais mecanismos permanecem inativos e são expressados depois de serem expostas a agente de indução, resultando em alterações metabólicas e fisiológicas correlacionadas com alterações na atividade de enzimas como, polifenoloxidase que transforma fenóis em

quinonas tóxicas aos microrganismos, peroxidase, envolvida no processo de lignificação celular, e fenilalanina amônia-liase, enzima precursora da síntese dos fenilpropanóides envolvidos na defesa vegetal (BONALDO; PASCHOLATI; ROMEIRO, 2005; LORENZETTI *et al.*, 2018; COSTA *et al.*, 2019).

O Brasil lidera há 20 anos o ranking mundial de exportação de OEs em geral, com aproximadamente 60 mil toneladas, outros países como Índia, China e Estados Unidos também se destacam nesse setor, de acordo com o último levantamento da ITC Trade Map (2021). A colocação do Brasil deve-se ao grande volume produzido de OE de laranja (*C. sinensis* Osbeck L.), um subproduto da indústria do suco (BIZZO; REZENDE, 2022). Experimentos demonstraram que o óleo de citros apresenta componentes como b-mirceno,  $\alpha$ -pineno, p-cimeno,  $\beta$ -pineno, terpinoleno, na qual o D-limoneno, componente majoritário, possui capacidade de inibir o crescimento micelial de *C. gloeosporioides* (CHENG *et al.*, 2022). Além de extrair OEs dos resíduos do processamento industrial, outra alternativa seria extrair OEs de frutos provenientes da queda natural das plantas ou até mesmo de frutos retiradas durante o raleio, em que são removidos com tamanho de 2-3 cm de diâmetro, ainda na fase imatura. Essa prática é comumente realizada por produtores de tangerinas que podem enfrentar alternância na produção. Com isso, vem crescendo estudos que comparam essas atividades antifúngicas entre frutos imaturos e maduros, como é demonstrado no trabalho de Menezes Filho (2021) no qual OEs extraídos tanto de frutos imaturos como maduros mostraram inibição de crescimento fúngico em isolados de *Sclerotinia sclerotiorum*, *C. acutatum* e *Aspergillus flavus*). Devite *et al.* (2023), apresentaram resultados promissores ao utilizar OEs de tangerina extraídos de frutos imaturos e maduros para controle de *Alternaria alternata*, *in vitro* e em folhas destacadas.

Esta ação também pode ser observada ao utilizar OEs extraídos das folhas, como evidenciado no estudo conduzido por Pires e Piccoli (2012). Neste estudo, os OEs das folhas de limão Cravo (*C. limonia*) e limão galego (*C. aurantifolia*) apresentaram maior efetividade na inibição micelial do fungo *Penicillium expansum*, confirmando o seu efeito fungicida. Duong *et al.*, (2023) demonstraram essa inibição ao testar OEs de *Citrus reticulata* x *sinensis* (cultivar Sanh) e *Citrus sinensis* (cultivar Xoan, Mat e Navel) sobre *C. gloeosporioides* e *C. scovillei*, para ambos a zona de inibição fúngica aumentou junto à concentração dos OEs. Apesar dos resultados promissores dos testes *in vitro*, é recomendado realizar novos experimentos que considerem as condições reais de epidemiologia da doença. Por isso, surge a ideia

de avaliar esses efeitos em condições de campo (*in vivo*), tanto em frutos maduros quanto em frutos imaturos, aproveitando os frutos que seriam descartados devido à queda natural das plantas, o que geraria uma renda adicional para os produtores. O uso de OEs de citros pode representar um avanço significativo no controle de fungos fitopatogênicos, oferecendo alternativas aos fungicidas sintéticos e garantindo um controle eficaz sem resíduos tóxicos para o ambiente.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Este estudo visa investigar a ação de óleos essenciais de tangerinas sobre o fungo *C. abscissum*, para o manejo da podridão floral dos citros.

### 2.2. Objetivos específicos

- Quantificar o rendimento dos óleos essenciais extraídos de frutos imaturo e maduros de tangerina IAC 2019Maria, tangor Murcott IAC 221 e mexerica Late IAC 585 e analisar a sua relação com a espessura de casca e diâmetro dos frutos.
- Identificar os principais componentes químicos presentes nos óleos essenciais das tangerinas.
- Avaliar o efeito de concentrações dos óleos essenciais das tangerinas na inibição do crescimento micelial, esporulação e germinação *in vitro* do fungo *C. abscissum*.
- Avaliar o efeito dos óleos essenciais no controle do *C. abscissum* em flores destacadas de lima ácida Tahiti
- Analisar a capacidade dos óleos essenciais em ativar os mecanismos de defesa nas plantas, pela ação da peroxidase, polifenoloxidase e fenilalanina amônia-liase.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1. Cenário atual da citricultura brasileira

A produção de citros no Brasil possui uma significativa contribuição para o comércio exterior, além do seu forte impacto socioeconômico no país. De acordo com os mais recentes dados publicados pela FAO (2024), em 2022 o Brasil posicionou-se como o segundo maior produtor global de citros, com uma produção aproximada de 20 milhões de toneladas. Vale notar que o país assume a liderança mundial quando se trata especificamente da produção de laranjas, com cerca de 17 milhões de toneladas. A região sudeste do Brasil é a maior produtora de cítricos, tendo São Paulo como principal estado, representando 77% da produção nacional de laranja, 74% de limão e 32% de tangerina (IBGE, 2024). Em relação aos números apresentados pela Markestrat (2022), o setor citrícola de São Paulo e Triângulo/Sudoeste de Minas Gerais movimentava aproximadamente US\$ 14 bilhões por ano, contribuindo com R\$ 2 bilhões para o Produto Interno Bruto (PIB) brasileiro somente através das exportações. Além disso, esse setor é responsável por 200 mil empregos diretos, conforme dados da CitrusBR (2019).

Os citros pertencem à família Rutaceae e principalmente aos gêneros *Citrus*, *Poncirus*, *Fortunella* e *Microcitrus* spp. O gênero *Citrus* é o mais cultivado, constituído por plantas de porte médio, flores de coloração branca e aromáticas, com frutos do tipo baga de coloração e formas variadas. Nacionalmente predomina-se o cultivo de laranjas doces [*C. sinensis* (L.) Osbeck] destinadas ao processamento de suco e para mercado de frutas frescas (SWINGLE; REECE, 1967). Além das laranjas, a cultura se baseia em limas doces (*C. limettioides* Tanaka), limões (*C. limon* Lush), limas ácidas (*C. latifolia* Tanaka e *C. aurantifolia* Tanaka), laranja-azedada (*C. aurantium* L.), pomelos (*C. paradisi* Macfadyen) e tangerinas (*C. reticulata* Blanco) e mexericas (*C. deliciosa* Tenore) (GIRARDI *et al.*, 2021). Para as tangerinas ou mandarinas existem muitas variedades, sendo que são quatro as de uso comercial: as satsumas, as mexericas, as do grupo king e as tangerinas comuns (DONADIO; STUCHI; CYRILLO, 1998).

Ao considerar apenas as tangerinas, o Brasil é o quinto maior produtor mundial, com uma produção de 1,09 milhão de toneladas em 2022 (FAO, 2024). Nacionalmente vem ocorrendo o plantio de novas variedades como tangerina IAC 2019 Maria, um híbrido produzido a partir de cruzamento controlado entre tangor Murcott IAC 221 [C.

*reticulata* Blanco x *C. sinensis* (L.) Osbeck] x laranja Pera IAC [*C. sinensis* (L.) Osbeck] e mexerica Late IAC 855 (*C. deliciosa* Tenore). Outras variedades como tangerina Ponkan (*C. reticulata* Blanco) e o tangor Murcott IAC 221 já são popularmente cultivadas e ocupam 86% da área plantada com tangerinas (BASTIANEL *et al.*, 2014; FUNDECITRUS, 2024).

### 3.2. Óleos essenciais e atividade antimicrobiana

Em geral, os OEs são substâncias voláteis aromáticas presentes em materiais vegetais como frutos, cascas, sementes, polpas, folhas e raízes. São formados no citoplasma das células vegetativas e existem como pequenas gotículas entre essas células (RIOS, 2016). Naturalmente as plantas produzem os OEs através do metabolismo secundário com a finalidade de se proteger contra ataques de predadores, como insetos e microrganismos, além de atrair polinizadores para dispersão de pólenes e sementes (BAKKALI *et al.*, 2008). A composição química dos OEs de plantas difere entre as espécies e é afetado por fatores que incluem a localização geográfica, o ambiente, o estágio de maturidade e o método de extração. Essa diferença química está diretamente correlacionada com diferenças nas atividades biológicas (NAZARO *et al.*, 2013). Caló *et al.* (2015) relataram que os OEs são constituídos por numerosos compostos, como hidrocarbonetos aromáticos, terpenos (monoterpenos e sesquiterpenos), terpenóides, ésteres, álcoois, ácidos, aldeídos e cetonas.

Por conter uma gama de compostos bioativos voláteis e orgânicos, naturais e biodegradáveis que atuam sinergicamente, os OEs são capazes de realizar atividades antimicrobianas, herbicidas, inseticidas, antioxidantes e fungicidas (ZHANG *et al.*, 2018; FENG *et al.*, 2019; JAHANI *et al.*, 2020; MATOS *et al.*, 2020; MEHDIZADEH *et al.*, 2020; RASPO *et al.*, 2020). Além da presença desses compostos, outro aspecto importante é a sua propriedade hidrofóbica. Isso possibilita que eles se difundam nos lipídios das membranas celulares dos microrganismos e das mitocôndrias, resultando em maior flexibilidade ao afetar as estruturas celulares. Isso contribui para o vazamento de partículas vitais da membrana celular microbiana e, conseqüentemente, para a sua destruição (FERREIRA *et al.*, 2021). Alguns vegetais estão bem representados na literatura com efeito antimicrobiano, antioxidantes e anti-inflamatórias, como é o caso do OE de tomilho (ALSARAF *et al.*, 2020), orégano,

lavanda (MARTUCCI *et al.*, 2015; SMIGIELSKI *et al.*, 2018), canela, cravo (PURKAIT *et al.*, 2020) e açafrão (MENG *et al.*, 2018).

Antes de investigar a atividade biológica, os OEs de citros já eram amplamente utilizados na indústria de cosméticos na preparação de perfumes, sabonetes e outros produtos de cuidado corporal. Como mencionado, são uma mistura complexa de compostos voláteis pertencentes a diversas classes químicas, incluindo hidrocarbonetos monoterpênicos, hidrocarbonetos sesquiterpênicos, monoterpênicos oxigenados e sesquiterpênicos oxigenados (BUSTAMANTE *et al.*, 2016). Se acumulam em cavidades espalhadas no flavedo dos citros (AHMAD *et al.*, 2006). Os principais hidrocarbonetos monoterpênicos identificados nos óleos de casca de tangerina foram limoneno, mirceno,  $\gamma$ -terpineno,  $\alpha$ -pineno e sabineno, enquanto o hidrocarboneto sesquiterpênico incluía o  $\beta$ -farneseno. Os componentes oxigenados incluíam aldeídos (decanal e octanal), álcool ( $\alpha$ -terpineol e linalol) e compostos ésteres (acetato de nerila e acetato de geranil) (KIRBAŞLAR *et al.*, 2009).

O OE de laranja doce (*Citrus sinensis* L.) é o principal óleo comercializado mundialmente com aproximadamente 55 mil toneladas no ano de 2018 (IFEAT, 2018). De acordo com dados do IBGE (2019), em 2018, no Brasil foram produzidas 154,6 mil toneladas de OEs de laranja doce, equivalentes a R\$ 1,5 bilhões ou US\$ 418 milhões, com volume exportado de 29 mil toneladas. Considerando outras espécies de citros, em 2020 o Brasil exportou 1,2 mil toneladas de OEs (Comex Stat, 2021).

Tais OEs podem ser extraídos das cascas dos frutos na qual é constituída por uma fina camada externa chamada flavedo e uma espessa e fibrosa camada interna, chamada albedo. O albedo, branco e esponjoso, contém várias substâncias que não são utilizadas na fabricação do suco, porém acabam sendo aproveitadas como subprodutos, a exemplo do d-limoneno, da pectina e alguns flavonóides (Citrus, 2020). Frutas cítricas com casca espessa como laranja azeda (*C. aurantium*), pomelo (*C. paradisi*) e *C. bergamia* contêm alto teor de OE em comparação com espécies cítricas com casca fina (HAOKIP *et al.*, 2023).

As cascas de frutas geradas pelas indústrias alimentícias ou no processamento do suco de laranja são tratadas como resíduos agrícolas e descartadas em aterros sanitários, compostadas, e usadas como alimento para o gado (CHANDA, 2010), porém, vale ressaltar que esse resíduo é uma fonte rica em OE e contém novos componentes promissores com potencial farmacológico, farmacêutico e econômico (SALÉM; SAEED, 2020), podendo ser destinado diretamente para esse setor. No caso

das tangerinas, frutas não processadas e consumidas *in natura*, o resíduo agrícola proveniente da cadeia produtiva são os frutos eliminados durante o raleio, que os produtores descartam completamente. O raleio é uma prática amplamente utilizada para otimizar a qualidade interna e externa das frutas cítricas nos principais países produtores de citros de mesa, e é feito após a queda fisiológica dos frutos, quando ainda estão imaturos. Nesse estágio, os OEs têm uma composição diferente dos frutos maduros (BOURGOU *et al.*, 2012), podendo apresentar outros comportamentos biológicos, tornando-os ainda mais interessantes para avaliações antimicrobianas. Além disso, essa prática também é economicamente viável, pois os produtores podem destiná-los à indústria para extração dos OEs.

Essa eficácia antimicrobiana dos OEs depende de sua composição química, das condições ambientais e do microrganismo em questão, e pode ser vista como a inibição do crescimento celular ou pela morte celular. A presença dos componentes limoneno, linalol, decanal, octanal, citral, citronelal, timol e  $\alpha$ -sinensal e o efeito sinérgico deles podem ser os responsáveis por essa ação ao afetar a estrutura da membrana celular, resultando na interrupção da força motriz do próton, do fluxo de elétrons, do transporte ativo e da coagulação do conteúdo das células microbianas (Yi *et al.*, 2018). Javed *et al.* (2015), relatou que o OE de tangerina (*C. reticulata*) possuía a maior atividade antimicrobiana, em relação a *C. sinensis*, *C. paradisi* e *C. limon*. Já eram descritos em trabalhos passados que OEs da casca de limão (*C. limon*), laranja doce (*C. sinensis*) e *C. bergamia* apresentam potentes propriedades antimicrobianas contra microrganismos comuns de origem alimentar, como bactérias, fungos e leveduras (FISHER; PHILLIPS, 2006) além de reduzir ou inibir o crescimento de fungos como *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Penicillium chrysogenum* e *P. verrucosum* (VIUDA-MARTOS *et al.*, 2008). Os resultados desses estudos acarretaram na formulação e registro de produtos à base de OEs, como é o caso do Previ-Am® Plus, tendo o OE de laranja doce como ingrediente ativo (óleo de laranja 6%). Além de inseticida, ele possui efeito fungicida, como é demonstrado no estudo de Lombardo *et al.*, (2023) com uma capacidade de reduzir em até 99% o crescimento micelial de *C. gloesporioides* na dosagem de 1%. O efeito antifúngico pode ser atribuído pela capacidade de afetar a barreira de proteção dos esporos ou agir antes mesmo da sua formação, resultando no crescimento anormal e/ou rompimento de tubos germinativos dos fungos (DANTIGNY; NANGUY, 2009). Tudo isso pode ser causado pela natureza lipofílica e baixo peso molecular dos terpenos e terpenóides, permitindo a

transferência mais fácil dos outros constituintes do OE para o interior da célula, na qual é revestida por uma camada lipídica (SANTOS *et al.*, 2012).

Tal efeito é demonstrado no trabalho de Menezes Filho (2021) no qual OEs extraídos tanto de frutos imaturos como maduros de *C. limonia* Osbeck mostraram inibição de crescimento fúngico em isolados de *Sclerotinia sclerotiorum*, *C. acutatum* e *A. flavus*. Pires e Piccoli (2012) concluíram que os OEs das folhas de *C. limonia* e *C. aurantifolia* melhor contribuíram para inibição micelial do fungo *P. expansum*, confirmando tal efeito fungicida. Observado também por Sharma e Tripathi (2006), onde o óleo de laranja (*C. sinensis*) reduziu tanto o desenvolvimento do *A. niger* como a germinação de seus esporos. Independentemente dos resultados promissores nos testes *in vitro*, novos experimentos são sugeridos a fim de considerar as condições reais de epidemiologia da doença, com isso, surge-se a ideia de avaliar tais efeitos a campo (*in vivo*), tanto de frutos maduros como também de frutos imaturos a fim de reaproveitar frutos que seriam descartados pelo raleio, proporcionando uma renda extra para o produtor. No trabalho de Devite *et al.*, (2023) o OE de tangerina apresentou resultados promissores no controle *in vitro* do fungo *Alternaria alternata*, tanto no teste *in vitro* como também aplicado em folhas infectadas com o patógeno, proporcionando os menores valores de severidade da doença nas folhas, tanto de forma curativa quanto preventiva.

Além dessa ação direta sobre os fitopatógenos, os OEs possuem a capacidade de promover a ativação dos mecanismos de defesa da planta proporcionando um controle indireto de doenças (Dalio *et al.*, 2020). Isso se deve ao fato de os OEs atuarem em diferentes mecanismos e rotas metabólicas nas plantas com funções relacionadas à sobrevivência e perpetuação da espécie, atraindo agentes polinizadores ou dispersores de propágulos vegetativos e na defesa contra predadores e microrganismos (HUET, 1991). Essa ativação de defesa pode envolver a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), alterações bioquímicas e estruturais, como demonstrado no trabalho de Ben-Jabeur *et al.* (2015), no qual o tratamento com OE de tomilho aumentou a atividade da peroxidase (POX), o que resultou na redução da gravidade do mofo cinzento e da murcha de *Fusarium* causada por *Botrytis cinerea* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici*, respectivamente. Quando aplicado em plantas de tangerina, o OE de *Cinnamomun zeylanicum* aumentou a atividade da catalase, ascorbato peroxidase, fenilalanina amônia liase e POX para controle de *A. alternata* (PERINA *et al.*, 2019).

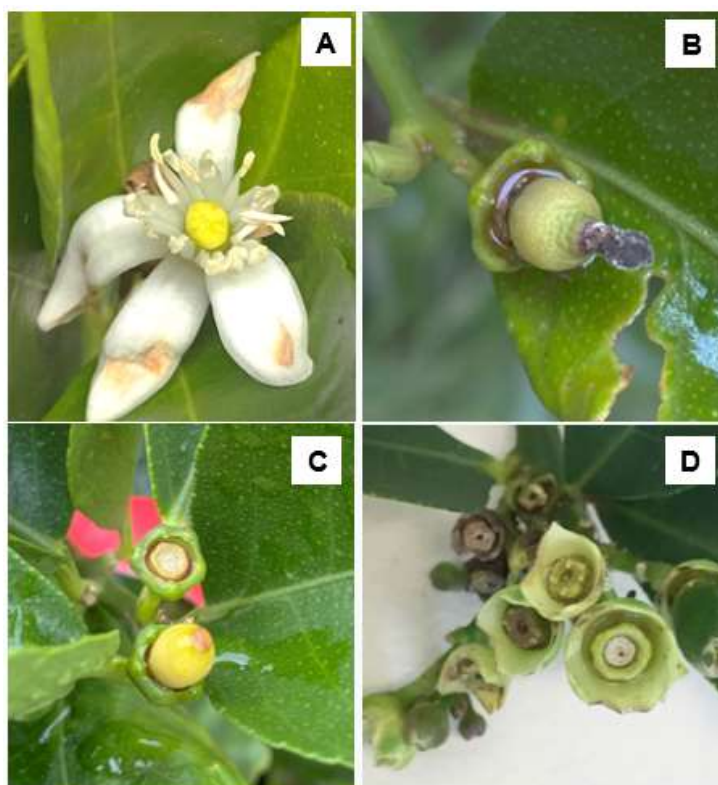
### 3.3. Podridão floral dos citros

A podridão floral dos citros (PFC), é uma doença endêmica em muitas regiões de clima tropical e subtropical produtoras de citros no mundo. A ocorrência e severidade da doença nessas regiões dependem da distribuição e a quantidade de chuvas no período de florescimento e da presença do patógeno em anos anteriores (SALVO FILHO, 1994; FEICHTENBERGER *et al.*, 2005). Assim que introduzida no pomar, a PFC possui uma ocorrência generalizada de difícil controle devido à presença de inóculo viável sobrevivendo em plantas assintomáticas, plantas daninhas ou até mesmo no solo. Nas plantas de citros, o patógeno sobrevive nas folhas em forma de conídios, apressórios ou na forma quiescente (AGOSTINI; TIMMER, 1992; ZULFIQAR *et al.*, 1996).

Os agentes causais da PFC são *Colletotrichum acutatum* (BROWN; SREENIVASAPRASAD; TIMMER, 1996; TIMMER *et al.*, 1994), posteriormente reclassificado como *C. abscissum* (PINHO *et al.*, 2015) pertencente ao complexo *C. acutatum*, e o *C. gloeosporioides sensu stricto* (LIMA *et al.*, 2011; MCGOVERN *et al.*, 2012). O fungo *C. gloeosporioides* foi o primeiro agente causal de PFC relatado (SIMMONDS, 1965; FAGAN, 1979). Na década de 1990, Agostini (1992) classificou isolados de *Colletotrichum* de citros em três grupos: *slow growing orange* (SGO), *key lime anthracnose* (KLA) e *fast-growing gray* (FGG). Os isolados dos grupos SGO e KLA foram associados à PFC e os isolados do FGG não foram patogênicos para flores de laranja doce. Isolados dos grupos SGO e KLA foram identificados, por meio de análise molecular, como *C. acutatum* e isolados do grupo FGG como *C. gloeosporioides* (BROWN; SREENIVASAPRASAD; TIMMER, 1996). No entanto, a espécie *C. gloeosporioides sensu stricto* foi associado como agente causal de PFC no Brasil (LIMA *et al.*, 2011) e nas Bermudas (MCGOVERN *et al.*, 2012). Em 2015, a nova espécie *C. abscissum* foi descrita também como agente causal da PFC no Brasil com base na análise de três isolados previamente classificados como *C. acutatum* (PINHO *et al.*, 2015). No Brasil a doença é causada principalmente por *C. abscissum* e com menor frequência por *C. gloeosporioides sensu stricto* (GONÇALVES *et al.*, 2021; SILVA *et al.*, 2017), o qual apresenta colonização endofítica nas folhas de laranja doce (WACULICZ-ANDRADE *et al.*, 2017). No Estado de São Paulo, independentemente da região e do cultivo da laranja doce, estima-se que *C.*

*abscissum* seja responsável por mais de 80% da incidência da doença (GONÇALVES *et al.*, 2021).

Os sintomas típicos dessa doença surgem de 2 a 7 dias após a infecção, em forma de lesões nas pétalas de flores de citros abertas, embora possa ser observado eventualmente em botões fechados (FAGAN, 1979; TIMMER *et al.*, 1994). Essas lesões possuem uma cor alaranjada devido à presença de acérvulos e abundantes conídios produzidos pelo patógeno (Figura 1A). Algumas lesões necróticas podem ser observadas no estigma das flores (Figura 1B). A infecção das flores leva a alterações hormonais, amarelecimento (Figura 1C) e abscisão dos frutos recém-formados, restando apenas os cálices retidos ao galho (Figura 1D), podendo permanecer por vários anos (TIMMER *et al.*, 1994; Li *et al.* 2003; MARQUES, 2020). A abscisão natural dos frutos de citros geralmente ocorre na base do pedúnculo, na fixação ao caule, porém, quando há a infecção, essa abscisão ocorre na base do fruto, deixando cálices e pedúnculos persistentes. As folhas ao redor das inflorescências infectadas geralmente tornam-se pequenas e desfiguradas (PERES *et al.*, 2005).

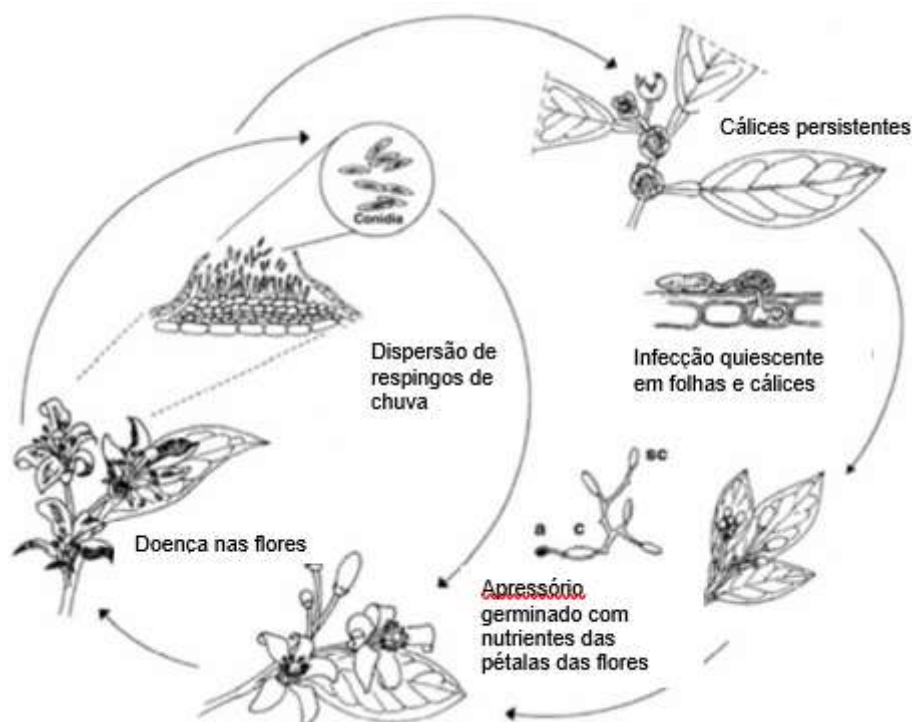


**Figura 1.** Sintomas da podridão floral dos citros causada pelo fungo *Colletotrichum abscissum*. A = Sintomas nas pétalas. B = Lesão necrótica no estigma. C = Amarelecimento e queda dos frutos. D = Cálice retido após queda prematura dos frutos. Fonte: autor

O ciclo da doença na Figura 2, revela que o fungo possui uma longa fase biotrófica em folhas maduras e cálices persistentes e a sua fase necrotrófica ocorre

apenas nas flores, isso ressalta que os apressórios nos tecidos maduros são essenciais para a sobrevivência do patógeno. Como as flores são o único tecido suscetível e ocorrem apenas sazonalmente, o fungo sobrevive como apressórios e infecções quiescentes nas folhas maduras (AGOSTINI; TIMMER, 1994; TIMMER *et al.*, 1994; ZULFIQAR *et al.*, 1996).

Os surtos da doença são mais frequentes em regiões onde a floração coincide com a estação chuvosa combinada com temperaturas amenas, afetando principalmente o sudoeste paulista. Os conídios são geralmente produzidos em acérvulos no tecido do hospedeiro e são tipicamente dispersos por respingos de chuva (SILVA JUNIOR *et al.* 2014), podendo causar até 80% de perdas na produção quando não tomadas medidas de controle (GOES *et al.*, 2008). No Sudeste do Brasil e na Flórida (EUA), as medidas de controle são adotadas de acordo com sistemas de previsão, baseados em componentes epidemiológicos da doença, que orientam a aplicação de fungicidas sistêmicos durante a floração, garantindo a sustentabilidade do controle químico (PERES *et al.*, 2004; SILVA-JUNIOR *et al.*, 2014; GAMA *et al.*, 2019). Todas as variedades de citros são suscetíveis ao patógeno. Normalmente os maiores danos são observados em variedades de laranja doce, principalmente as que possuem um florescimento desuniforme, como a laranja 'Pêra' (FEICHTENBERGER, 1991; SPADA, 2011).



**Figura 2.** Ciclo da podridão floral dos citros causada pelo fungo *Colletotrichum abscissum*. a = apressório; c = conídio; sc = conidiação secundária. Fonte: PERES, N. A. (2005)

Segundo Gama *et al.* (2020), a aplicação de fungicidas é a principal forma de controle da PFC, principalmente no estado de São Paulo, onde um número elevado de aplicações de fungicidas tem sido utilizado, sendo que em anos favoráveis para a doença principalmente no sudoeste paulista, os citricultores fazem até sete pulverizações por safra (SILVA JUNIOR, 2011). O tratamento consiste em aplicações de ingredientes ativos dos grupos químicos de triazóis, estrobirulinas e carboxamidas e o uso indiscriminado desses produtos pode contribuir para a ocorrência de resistência de linhagens fúngicas, representando também alto risco de impacto ambiental pela sua toxicidade e danos à saúde humana (BEBBER; GURR, 2015). Até o momento, isolados resistentes ainda não foram identificados em pomares paulistas. O insucesso no controle químico dessa doença está relacionado à ocorrência de dias consecutivos de chuvas com prolongamento do molhamento ou temperaturas baixas que prolongam o florescimento, associados à escolha errada do produto e a perda do momento correto de aplicação. A proteção deve ser realizada durante o período em que os tecidos são suscetíveis à infecção pelos patógenos, desde a fase de botões verdes e fechados até a fase de queda de pétalas, estigma e estilete (GOES *et al.*, 2008; SILVA JUNIOR *et al.*, 2014).

### 3.4. Indução de resistência em plantas

A resistência em plantas é fundamentada por dois tipos de mecanismos e barreiras, os que estão presentes nas plantas antes mesmo do contato com o patógeno, ou seja, pré-formados, e os mecanismos pós-formados, que estão ausentes antes da infecção do patógeno e são ativados quando a planta reconhece os sinais emitidos por um patógeno ou agente indutor, que ao entrar em contato com a planta possuem papel fundamental na indução de resistência (PASCHOLATI; DALIO, 2018). Nesse caso, a resistência induz a planta a se adaptar e conseguir sobreviver mesmo tendo seu desenvolvimento prejudicado (BONALDO *et al.*, 2005). Desta maneira, há uma elevação do nível de resistência, resultante da ativação de seus genes aparentemente inativos, com a utilização de agentes externos como indutores bióticos e abióticos (LUIZ *et al.*, 2016). Essa barreira pode ser mecânica ou química. A mecânica ocorre por meio do aumento da produção e deposição de alguma substância com a finalidade de conter a invasão do patógeno. Já a química envolve o aumento da atividade das proteínas de defesa, bem como na síntese de compostos fenólicos e fitoalexinas (OLIVEIRA *et al.*, 2016).

Esses agentes externos são chamados de elicitores ou eliciadores e são moléculas capazes de proteger contra infecções subsequentes por patógenos (STANGARLIN *et al.*, 1999). Como dito anteriormente, eles podem ser tanto de origem abiótica quanto biótica, dentre eles podem-se incluir os extratos de plantas e OEs (SCHWAN-ESTRADA *et al.*, 2003). Pesquisas vem indicando o potencial de extratos vegetais e OEs no controle de fitopatógenos tanto por sua ação fungitóxica direta quanto pela indução de resistência, indicando a presença de compostos com características de elicitores (STANGARLIN *et al.*, 2011).

A ativação do processo de mecanismos de defesa, pode ocorrer de forma local ou sistêmica. A proteção local se manifesta apenas nos tecidos que tiveram contato com o agente indutor. Já a sistêmica, a manifestação da indução ocorre em local diferente daquele onde houve a aplicação do tratamento (MORAES, 1992).

A aplicação desses indutores de resistência faz com que o vegetal fique em “alerta”, ou seja, pré-condicionado a acionar a sua defesa latente assim que houver o contato com o fitopatógeno (CONRATH *et al.*, 2015). Esse mecanismo acarreta em alterações na atividade enzimática nos metabolismos primário e secundário (STANGARLIN *et al.*, 2011). As plantas produzem uma grande diversidade de

metabólitos secundários, dentre eles os flavonoides e outros compostos fenólicos exercem ação na defesa contra fitopatógenos, dificultando sua entrada e impedindo a sua colonização na planta além de proporcionar ativação de enzimas, como peroxidases, polifenoloxidasas e fenilalanina amônia-liase (KURABACHEW; WYDRA, 2014; TAIZ *et al.*, 2017). Ao sofrer um estresse promovido por patógenos, a atividade dessas enzimas, tendem a aumentar em comparação aos tecidos não infectados (SOUZA *et al.*, 2015; DEMARTELAERE *et al.*, 2017).

Na indução de resistência, as peroxidases tem papel fundamental nos processos de defesa da planta e o aumento de sua atividade está diretamente relacionada à redução da severidade da doença (ARAUJO; MENEZES, 2009). São classificadas como proteínas relacionadas à patogênese, pertencentes a família PR-9 (PASSARDI *et al.*, 2005) e participam de inúmeros processos fisiológicos nos tecidos das plantas, incluindo a lignificação, a qual interferem com o crescimento de patógenos através de modificações químicas nas paredes celulares (VAN LOON; VAN STRIEN, 1999). Ao formar a lignina, o desenvolvimento do fungo é afetado, uma vez que torna as paredes celulares mais resistentes a penetração do patógeno, havendo um bloqueio físico, ou pelo fato de reduzir a difusão de nutriente para o fungo, além de toxinas e enzimas que são liberadas pelo fungo (LORENZETTI *et al.*, 2018). Segundo Araujo e Stadnik (2013), os níveis de peroxidases são mais elevados em plantas resistentes quando em comparação com plantas suscetíveis, isso está associado ao rápido reconhecimento do ataque do patógeno e da ativação de defesas eficazes.

As polifenoloxidasas (PFO) são encontradas em espécies de plantas, bactérias, fungos e algas, principalmente em tecidos atacados por insetos ou patógenos. Sua capacidade de oxidar compostos fenólicos em quinonas, assim como as peroxidases, faz com que tenha papel fundamental na resistência contra doenças, já que para os microrganismos as quinonas são mais tóxicas que o fenol original (BARROS *et al.*, 2010). Elas geralmente permanecem em estado inativado, intracelularmente, dentro dos tilacóides nos cloroplastos (MAYER; STAPLES, 2002; TRAN; TAYLOR; CONSTABEL, 2012). À medida que ocorre a ruptura da célula ocasionada pela ação de insetos ou patógenos, a enzima é liberada dos tilacóides e se inicia o processo de oxidação dos compostos fenólicos que também são liberados dos vacúolos, produzindo quinonas (THIPYAPONG *et al.*, 2004) que apresentam ação antimicrobiana (LIU *et al.*, 2005; MOHAMMAD; KAZEMI, 2002). As polifenoloxidasas

também participam do processo de lignificação durante a invasão do patógeno (JUNG *et al.*, 2009; MOHAMMAD; KAZEMI, 2002).

A fenilalanina amônia-liase (FAL) tem como função o suporte mecânico da planta proporcionado pela lignina, atua também na síntese de antioxidantes e compostos que agem como protetores contra estresses abióticos e bióticos (DIXON, LAMB, 1990). Está localizada nos cloroplastos das células vegetais e participa de reações do metabolismo dos compostos fenólicos, responsável pela desaminação da L-fenilalanina, desencadeando reações metabólicas que, por sua vez, geram produtos baseados em fenilpropanos, incluindo a lignina que confere maior resistência a parede celular (DIXON; PAIVA 1995; MONTEIRO *et al.*, 2004; STANGARLIN *et al.*, 2011). Essa enzima está envolvida na biossíntese de fitoalexinas derivadas dos fenilpropanóides (PASCHOLATI, 2011) que pode ser induzida por agentes eliciadores como o ácido salicílico e o metil jasmonato (YAO; TIAN, 2005) e também na expressão de outras proteínas PR, como  $\beta$ -1, 3-glucanases (família PR-2) e quitinases (Família PR-3), que estão diretamente ligadas a degradação da parede celular dos fungos (PATEL *et al.*, 2017).

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. Local do experimento**

O trabalho foi realizado no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de São Carlos, no campus localizado no município de Araras - SP (22° 21' 25" S 47° 23' 02" O), na qual utilizou-se o Laboratório de Nematologia (LANEM) para as análises e coleta dos resultados.

### **4.2. Isolamento e preparo do fungo *Colletotrichum abscissum***

O *C. abscissum* foi obtido através do método de isolamento indireto no qual, porções infectadas foram retiradas de pétalas de flores de lima ácida Tahiti localizadas no campo experimental do Centro de Ciências Agrárias da UFSCar-Araras(SP), onde o patógeno encontrava-se em crescimento ativo, e assim transferidas para o meio de cultivo. Para isso, o tecido infectado passou por um processo de desinfecção superficial pela imersão em álcool 70% por 1 min., hipoclorito de sódio a 2% por 1 min., e em seguida, enxaguados com água destilada (ALFENAS *et al.*, 2007). Após a desinfecção, foi transferido para placa de Petri contendo meio BDA (Ágar, Batata e Dextrose), e acondicionada em incubadora do tipo BOD (Demanda Bioquímica de Oxigênio) na temperatura de 25°C, com fotoperíodo de 12 horas. A partir do crescimento fúngico, o mesmo foi transferido para novas placas contendo meio BDA, então, armazenadas e mantidas por sete dias até a realização do experimento e preparo do inóculo.

#### **4.2.1. Análise morfológica do *C. abscissum***

Após a repicagem do isolado para placas de Petri contendo meio BDA, as mesmas foram mantidas a 25°C, com fotoperíodo de 12h. Sete dias após a incubação, foram obtidas suspensões de conídios com a adição de 10 mL de água destilada na placa e posteriormente feita a raspagem com alça de Drigalski e filtragem em dupla gaze. Com a suspensão, foram confeccionadas placas de Petri para obtenção de uma cultura monospórica pura do isolado e assim feita a observação dos conídios em lâminas. Além de verificados o tamanho e a forma de 100 conídios, foram observadas também as características morfológicas e de crescimento da colônia do isolado. Os conídios foram mensurados indiretamente através de sistema de videocâmara

acoplado ao microscópio óptico, com imagem transmitida para o computador e analisada por meio do programa BELCapture calibrado com a utilização de lâmina micrométrica.

### 4.3. Seleção e preparo dos frutos de tangerinas

Foram colhidos frutos imaturos e maduros das variedades de tangerina IAC 2019Maria [(*Citrus reticulata* x *C. sinensis*) x *C. sinensis*], tangor Murcott IAC 221 (*Citrus reticulata* x *C. sinensis*) e mexerica Late IAC 585 (*Citrus deliciosa*) (Figura 3), enxertadas em limão Cravo (*C. limonia*), em diferentes posições de plantas com aproximadamente cinco anos de idade em pomar experimental localizado no Centro de Citricultura Sylvio Moreira do Instituto Agrônomo (IAC) em Cordeirópolis, SP. Esses frutos serviram para medições de espessura da casca, diâmetro dos frutos e extração de óleo essencial da casca. O período de colheita coincidiu nos meses de março e abril para frutos imaturos, e entre maio e julho para frutos maduros de acordo com o tempo de maturação de cada variedade.



**Figura 3.** Variedades de tangerinas selecionadas para medições de espessura de casca, diâmetro dos frutos e extração de óleo essencial da casca. A) tangerina IAC 2019 Maria; (B) mexerica Late IAC 585 e (C) tangor Murcott IAC 221. Fonte: Germoplasma de citros (CAPTACSM)

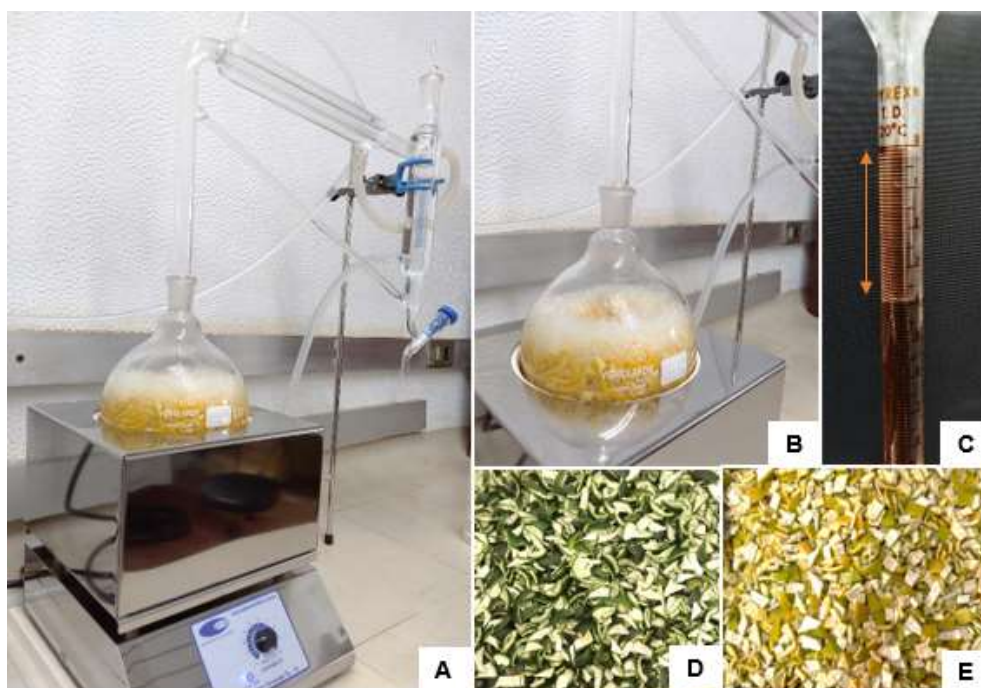
#### 4.3.1. Espessura da casca e diâmetro dos frutos

Os frutos colhidos das três variedades de tangerinas nos dois estágios de maturação foram selecionados e com auxílio de um paquímetro, foram medidos o diâmetro, espessura total da casca (epicarpo + mesocarpo) e somente o epicarpo, porção externa da casca onde se localizam as glândulas de óleo. Para obter a espessura do albedo (mesocarpo), calculou-se a diferença entre espessura total da casca e espessura do epicarpo. Para análise dos dados, foram consideradas cinco repetições contendo quatro frutos cada, onde foram feitas três medições, sendo: uma próxima ao pedúnculo, outra na parte média do fruto, e uma terceira na parte basal.

### 4.3.2. Extração dos óleos essenciais de tangerinas

Para a extração do óleo essencial, uma porção de 400 g das cascas cortadas com tamanho aproximado de 5 cm<sup>2</sup> foram acondicionadas no destilador de OEs tipo *Clevenger* acrescidos com 800 mL de água destilada, e assim submetido ao método de hidro destilação por arraste a vapor, dentro de um período de quatro horas (Figura 4). Assim que extraídos, os OEs foram armazenados em frascos de vidros âmbar e estocados à -18°C. Ao final, foi calculado o rendimento médio de óleo para cada variedade e para cada estágio de maturação, seguindo a equação:

$$\text{Rendimento médio (\%)} = \frac{\text{volume de óleo obtido (ml)}}{\text{massa de casca (g)}} \times 100$$



**Figura 4.** Extração de óleo essencial da casca de tangerinas. (A) e (B) Extração do óleo no destilador tipo *Clevenger* (SL-76/2000); (C) Produto final da destilação; (D) e (E) Cascas cortadas de frutos imaturos e maduros, respectivamente. Fonte: autor

### 4.4. Análise cromatográfica dos óleos essenciais

Foram realizadas análises quantitativas e identificação individual do perfil químico dos OEs das variedades utilizadas no experimento. Para a análise quantitativa utilizou-se cromatógrafo de gás Shimadzu GC-14B (Tóquio, Japão) equipado para ionização por chama (FID) e software de processamento de dados (EZ-Chrom, Shimadzu Corp.), e um GC-MS QP 5050A (Shimadzu Europa). A

quantificação de cada componente foi realizada de acordo com Frizzo *et al.* (2004) usando tetradecano (Sigma Aldrich, EUA) como padrão interno. Já a identificação individual das substâncias baseou-se na comparação de espectros de massa com bibliotecas comerciais e calculando as taxas de retenção linear (IRL) em duas colunas capilares de polaridade diferente: pouco polar (SE-52, Mega, Legnano, Itália) e polar (CW-20M, Mega, Legnano, Itália). Essas análises foram realizadas pela empresa BioCitrus, localizada em Monte Negro, RS.

#### **4.5. Efeito dos óleos essenciais sobre *C. abscissum* in vitro:**

Para avaliar o efeito dos OEs sobre o fungo, foram testadas as concentrações de 0; 2; 4; 8; 16 e 32  $\mu\text{L mL}^{-1}$  das diferentes variedades cítricas somadas à testemunha positiva com fungicida comercial trifloxistrobina ( $100 \text{ g.L}^{-1}$ ) + tebuconazol ( $200 \text{ g.L}^{-1}$ ). Os tratamentos foram incorporados em meio de cultura BDA com o tensoativo hidrofílico Tween<sup>®</sup> 80 (0,5%) nas placas de Petri contendo 20 mL do meio, onde foram dispostos ao centro da placa discos miceliais de 0,6 cm de diâmetro retirados da cultura de sete dias do patógeno, e assim lacradas e armazenadas em incubadora BOD a 27°C com fotoperíodo de 12 horas.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em duplicata, com cinco repetições em esquema fatorial 3x6+1, sendo três OEs de tangerinas em seis concentrações com uma testemunha adicional. Foram realizados experimentos com OEs de frutos imaturos e maduros que seguiram a mesma metodologia e condições, porém instalados em épocas diferentes. As variáveis analisadas foram: crescimento micelial e esporulação.

O crescimento micelial foi mensurado diariamente com a utilização de um paquímetro digital, correspondente à média de duas medidas perpendiculares do diâmetro da colônia (Figura 5), realizado até a placa da testemunha estar completamente tomada pelo micélio do fungo. Feito isso, determinou-se a porcentagem de inibição de crescimento micelial (PICM); (BASTOS, 1997) em relação à dosagem 0  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM); (OLIVEIRA, 1991), e a área abaixo da curva de crescimento micelial (AACCM), expressa em  $\text{cm}^2$ , adaptado de Campbell e Madden (1990), mostradas nas equações abaixo:

$$PICM = \frac{(\text{Crescimento da testemunha} - \text{Crescimento do tratamento}) \times 100}{\text{Crescimento da testemunha}}$$

$$IVCM = \sum \frac{\text{Diâmetro médio atual} - \text{Diâmetro médio anterior}}{\text{Número de dias após a inoculação}}$$

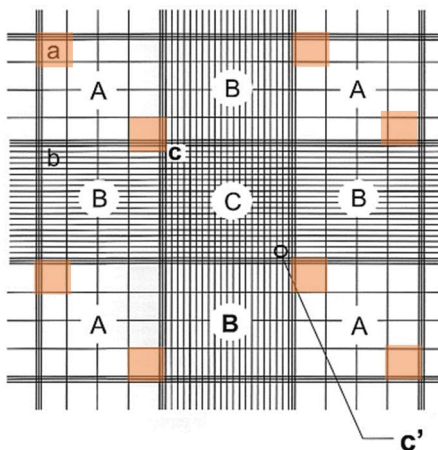
$$AACCM = \sum \left( \left( \frac{\gamma_i + \gamma_{i-1}}{2} \right) \times (\tau_i - \tau_{i+1}) \right)$$

Na qual o crescimento micelial observado em dois dias consecutivos é representado por  $\gamma_{i+1}$  e  $\gamma_i$  e o período das avaliações por  $\tau_{i+1}$  e  $\tau_i$ .



**Figura 5.** Demonstração da marcação para mensurar o crescimento micelial do fungo *Colletotrichum abscissum*. Fonte: autor

Ao final das medições de diâmetro micelial, avaliou-se a esporulação do fungo, adicionando-se 10 mL de água destilada esterilizada em cada placa de Petri, obtendo a suspensão de esporos após a raspagem com alça de Drigalski a qual foi filtrada em dupla gaze e retirada uma alíquota de 10  $\mu\text{L}$  para a contagem dos conídios em câmara de Neubauer em microscópio óptico. Seguiu-se a metodologia para esporos de menor tamanho e suspensões ligeiramente mais concentrada, a qual fez-se a contagem de dois subcompartimentos “a” nos cantos diagonais opostos de cada quadrante “A” (ALFENAS; ZAUZA; MAFIA, 2007), totalizando oito leituras e assim calculando-se a média de número de esporos  $\text{mL}^{-1}$  (Figura 6).



**Figura 6.** Esquema de um hemacitômetro tipo Neubauer: compartimentos (A, B e C) e subcompartimentos (a, b e c) da lâmina. Fonte: Alfenas, Zauza e Mafia (2007).

#### 4.5.1. Germinação de esporos do *C. abscissum*

Para avaliar a germinação dos esporos de *C. abscissum*., procedeu-se ao preparo convencional de meios de cultura Ágar-água, contendo as mesmas concentrações de óleo essencial de tangerina e fungicida citados anteriormente (item 4.5), incorporados com Tween® 80 (0,5%) e pentabiótico. Em placas de Petri contendo 10 mL do meio de cultura já solidificado e com auxílio de um perfurador de metal com 2 cm de diâmetro foram demarcados os locais onde depositaram-se alíquotas de 10 µL da suspensão de esporos do fungo, preparadas através da raspagem de uma colônia fúngica com aproximadamente 14 dias diluída e calibrada para  $1 \times 10^6$  esporos  $\text{mL}^{-1}$  do fungo. A placas de Petri foram incubadas em BOD com alternância de fotoperíodo, num esquema de duas horas na luz, seguida de doze horas de escuro, com mais uma hora de luz, à 25 °C, totalizando 15 horas. Finalizado o período de incubação, foi depositada uma gota do corante azul de algodão de lactofenol sobre cada local demarcado, com o intuito de paralisar, simultaneamente, a germinação de esporos em todos os tratamentos. A avaliação foi feita pela visualização das estruturas reprodutivas do fungo no microscópio óptico. Foram contados 100 esporos por local demarcado, sendo considerados germinados aqueles que apresentaram 2/3 do desenvolvimento do tubo germinativo. Os resultados foram expressos em porcentagem. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em duplicata, com quatro repetições em esquema fatorial  $3 \times 6 + 1$ , sendo três OEs de tangerinas em seis concentrações com uma testemunha

adicional. Cada placa de Petri representava um tratamento, e nela continha as quatro repetições representadas pelos locais perfurados.

#### 4.6. Óleos essenciais no controle da PFC em flores destacadas

Para avaliar o efeito fungicida dos OEs em flores destacadas, utilizou-se uma metodologia adaptada de Goulin *et al.* (2019). Flores de lima ácida Tahiti foram coletadas um dia após a antese de plantas localizadas no Centro de Ciências Agrárias – UFSCar e levadas para o laboratório, onde foram tratadas com os OEs das três variedades de tangerinas extraídos de frutos imaturos e maduros na dosagem que apresentou melhor efeito inibitório do crescimento micelial do patógeno *in vitro* ( $32 \mu\text{L mL}^{-1}$ ), além do fungicida (trifloxistrobina ( $100 \text{ g L}^{-1}$ ) + tebuconazol ( $200 \text{ g L}^{-1}$ )) e uma testemunha negativa (água). As flores foram pulverizadas com os tratamentos e logo transferidas para placas contendo ágar-água, sendo elas fechadas com uma segunda base de placa e estabilizadas com Parafilm®, foram armazenadas em BOD à  $22^\circ\text{C}$  sem fotoperíodo, e mantidas por 18 horas para posteriormente serem inoculadas. Em cada pétala foram depositados  $5 \mu\text{L}$  de suspensão de esporos de *C. abscissum* na concentração de  $5 \times 10^5$  (Figura 7). Após a inoculação, as placas retornaram para a BOD, as quais permaneceram por 48 horas com fotoperíodo de 12 h à  $25^\circ\text{C}$ , para permitir a avaliação da presença ou ausência dos sintomas característicos do PFC. O experimento foi instalado em blocos ao acaso e consistiu em sete repetições para cada tratamento, sendo uma repetição uma placa de Petri contendo quatro flores.



**Figura 7.** Inoculação das pétalas de flores destacadas de lima ácida Tahiti com suspensão de esporos de *Colletotrichum abscissum* em placas de Petri contendo meio ágar-água.

#### **4.7. Avaliação da indução dos mecanismos de defesa das plantas pelos óleos essenciais**

Esse experimento foi conduzido em casa de vegetação localizado no Centro de Citricultura Sylvio Moreira – IAC onde avaliou-se o efeito dos tratamentos mencionados no item 4.6 na indução de mecanismos de defesa de mudas de laranja Valência. Cada tratamento foi composto por cinco repetições, as quais foram representadas por uma muda. Os tratamentos foram aplicados por aspersão até o ponto de escorrimento nos ramos jovens e em seguida envoltos por um saco plástico para evitar a volatilização rápida dos OEs. Após 72 horas da aplicação foi feita a coleta das amostras foliares e imediatamente congelada e mantida a  $-80^{\circ}\text{C}$  para a realização das análises bioquímicas.

##### **4.7.1. Análises bioquímicas:**

Atividade de polifenolxidasas: A atividade da PPO foi determinada pelo método adaptado de Kar & Mishra (1976), pela mensuração da conversão do catecol em quinona. 500mg da amostra foliar foram macerados em nitrogênio líquido e levados a centrifuga à 6.000 a 10.000 rpm por 5-10 minutos com 5 mL da solução tampão de fosfato de potássio pH 6,7 a 0,2M. Para a reação, em tubos de ensaio, foi adicionado 3 mL do sobrenadante da amostra + 1,85 mL de catecol 0,1 M e levados a  $30^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos. As leituras foram feitas após a adição de 0,8 mL de ácido perclórico, a 395 nm. A atividade enzimática foi obtida em  $\mu\text{mol}$  catecol transformado  $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$  de massa fresca.

Atividade de peroxidases: A atividade da POD foi estimada pelo método de Lima et al. (1999). Após a pesagem e maceração em nitrogênio líquido de 500 mg da amostra foliar, foi adicionado 5 mL da solução tampão de fosfato de potássio pH 6,7 a 0,2M. Após a centrifugação à 6.000 a 10.000 rpm por 5-10 minutos, 1 mL do sobrenadante foi adicionado a 0,5 mL de 30% peróxido de hidrogênio em tampão fosfato de potássio 0,2 M (pH 6,7) e 0,5 mL de solução de fenol e aminoantipirina. Em seguida, os tubos permaneceram em  $30^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos sendo interrompida a reação com adição de etanol absoluto. A atividade enzimática foi realizada em 505 nm e expressa em  $\mu\text{mol}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  decomposto  $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$  de massa fresca.

Atividade de fenilalanina amônia-liase (PAL): Utilizou-se o método adaptado de Peixoto et al., 1999. Foi misturado 100 mg de amostra com 10 mL de 0,1 M de tampão de borato (pH 8,8) contendo 1,2 mL de  $\beta$  mercaptoetanol, 50g (5%) de

polivinilpirrolidona (PVPP). Esta mistura foi centrifugada por 20 minutos à 4° C. A reação foi iniciada pela adição 1mL do extrato + 1mL de tampão borato 0,2M (pH 8,8) e 1 mL de fenilalanina após 5 minutos de banho-maria a 36°C. Em seguida, os tubos permaneceram por mais uma hora a 36°C. A reação foi finalizada pela adição de 0,1mL (100µL) de HCl 6N. A leitura foi feita a 290 nm. Um coeficiente de extinção de  $10^4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  foi utilizado para calcular a atividade de PAL, que foi expressa como  $\text{mmols min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  de massa fresca.

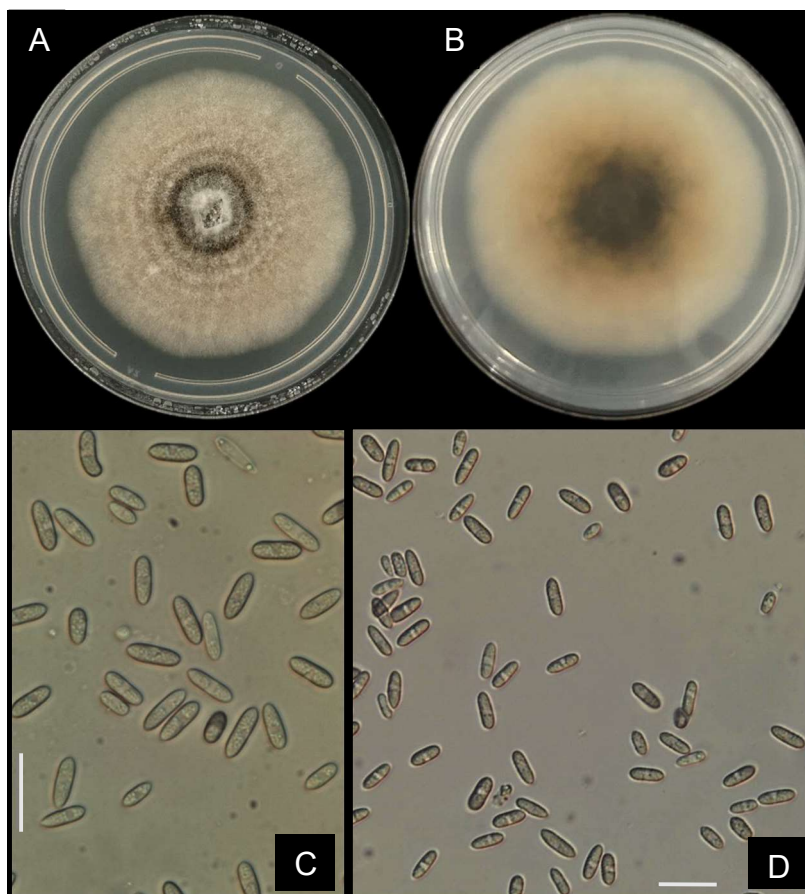
#### **4.8. Análise estatística**

Os valores obtidos para as variáveis analisadas foram submetidos à análise de variância, as médias dos tratamentos comparadas pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade e as dosagens submetidas a regressão, ambas pelo software R. Para a variável esporulação, os dados foram transformados para raiz quadrada. Para rendimento de OE e espessura da casca do fruto, foi realizada a correlação de Pearson. As variedades de tangerinas nos dois estágios de maturação foram usadas na análise de componentes principais (PCA) para distinguir as variedades quanto às características dos frutos, componentes dos OEs e ação sobre o *C. abscissum*, utilizando-se o software R.

### **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **5.1. Análise morfológica do *C. abscissum***

As colônias do isolado, cultivado em BDA, apresentaram margens inteiras, com coloração salmão a pêssego na superfície devido a esporulação, com setores parcialmente cobertos por micélio aéreo flocado branco, tornando-se cinza a preto no centro. Observou-se conídios hialinos, paredes lisas, asseptados, retos, cilíndricos, base arredondada, ápice agudo, às vezes estreitado no centro, com comprimento entre 7,5 -12,5 µm e largura de 2,9-4,5 µm (Figura 8). Tanto as estruturas assexuadas como as características da cultura estão de acordo com a descrição de Pinho *et al.*, (2015) e de Bragança *et al.*, (2016).



**Figura 8.** Crescimento micelial de *Colletotrichum abscissum* em meio batata-dextrose-àgar após 15 dias de cultivo. (A) Frente e (B) verso da placa de Petri. (C e D) Conídios - Escala = 20 $\mu$ m. Fonte: Autor.

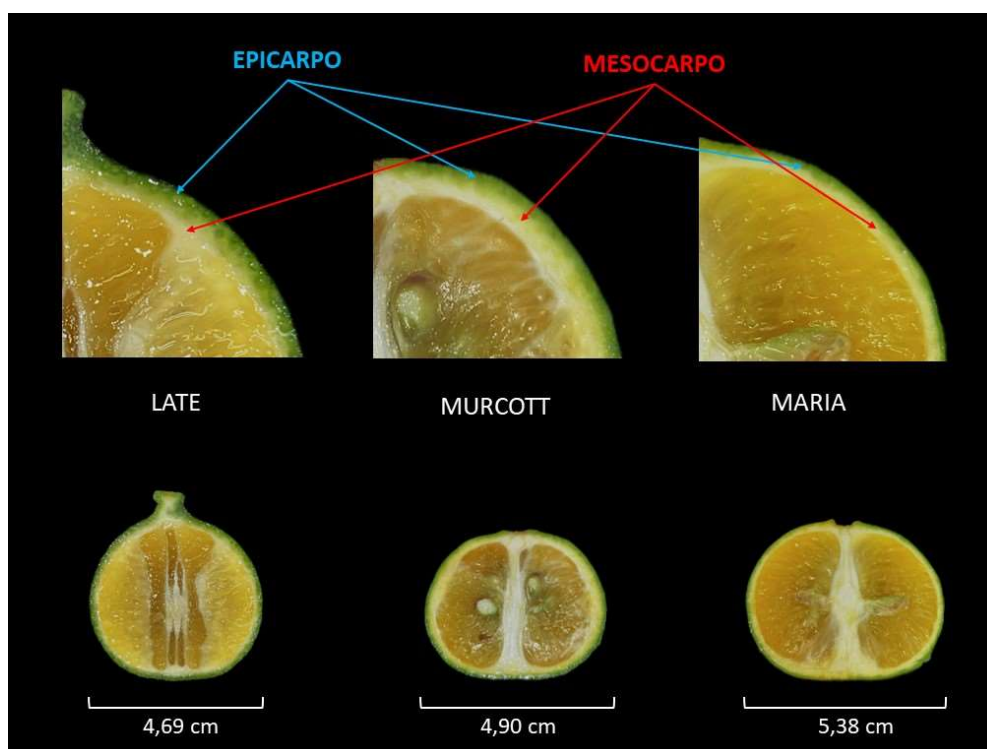
## 5.2. Espessura da casca, diâmetro dos frutos e rendimento dos OEs

Os frutos imaturos apresentaram um diâmetro médio de cerca de 5 cm, destacando-se a tangor Murcott IAC221 que além de apresentar o maior diâmetro, se diferenciou das demais variedades com maior espessura total e mesocarpo da casca. Para frutos maduros, o diâmetro médio das variedades foi de aproximadamente 7 cm, sendo a maior parte da espessura de casca total da tangor Murcott IAC221 representada pelo mesocarpo. Observando apenas o epicarpo, porção da casca onde se localiza a maior parte das glândulas de OE, a variedade Late IAC 585 se diferenciou das demais com 0,15 cm de espessura quando imaturo e 0,21 cm quando maduro, correspondendo a mais da metade da sua espessura total da casca (Tabela 1). Nos citros, a região do epicarpo também chamada de flavedo, contém inúmeras glândulas de óleo, consistindo em cavidades secretoras que são revestidas por várias camadas de células epiteliais especializadas (VOO et al., 2012) (Figura 9 e 10).

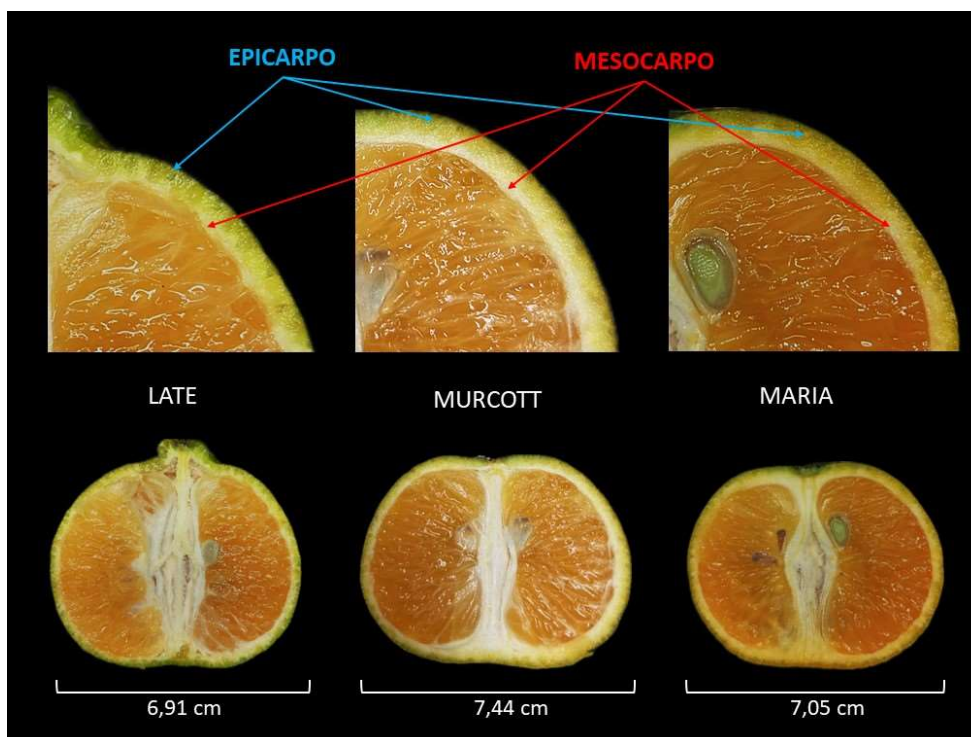
**Tabela 1.** Diâmetro e espessura da casca (epicarpo, mesocarpo e total) de frutos imaturos (I) e maduros (M) de tangerinas enxertadas em limão Cravo.

Variedades	Diâmetro (cm)		Epicarpo (cm)		Mesocarpo (cm)		Espessura total (cm)	
	I	M	I	M	I	M	I	M
<b>Murcott IAC221</b>	5,38 aB	7,44 aA	0,12 bB	0,17 bA	0,28 aA	0,18 aB	0,39 aA	0,36 aA
<b>IAC 2019Maria</b>	4,90 bB	7,05 bA	0,10 cB	0,14 cA	0,21 bA	0,17 aA	0,30 bA	0,31 bA
<b>Late IAC 585</b>	4,69 bB	6,91 bA	0,15 aB	0,21 aA	0,12 cA	0,11 bA	0,27 bB	0,32 bA

Médias seguidas de mesma letra (maiúsculas diferenciando entre maturação da mesma variedade e minúsculas diferenciando entre as variedades dentro da mesma maturação) não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

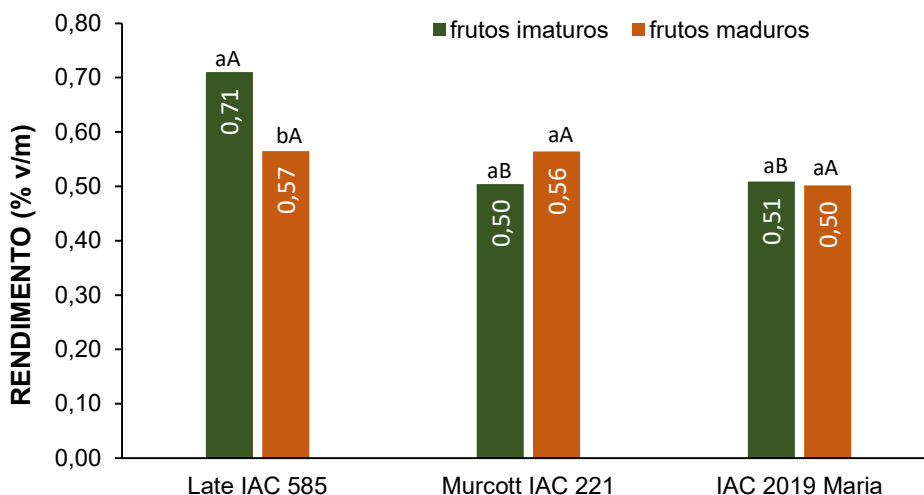


**Figura 9.** Representação visual do diâmetro e espessura de casca dos frutos colhidos imaturos das variedades de tangerinas enxertadas em limão cravo



**Figura 10.** Representação visual do diâmetro e espessura de casca dos frutos maduros das variedades de tangerinas enxertadas em limão Cravo

Observou-se que a mexerica Late IAC 585 apresentou maior rendimento (0,71%) de OE extraído de frutos imaturos, se diferenciando das demais variedades, as quais se aproximaram de 0,5% de rendimento. Quando se compara a maturação dos frutos, a variedade Late IAC 585 é a única a possuir diferenças no rendimento, tendo o rendimento reduzido para 0,57% quando extraídos de frutos maduros, seguida das variedades Murcott IAC 221 (0,56%) e IAC 2019Maria (0,5%) (Figura 11). O rendimento em OE pode variar desde 0,3% até cerca de 1,5% em massa (PAULETTI, 2018). Ressalta-se que variações nos rendimentos podem ocorrer, em geral, devido a diversos fatores como: método de armazenamento das cascas, diferenças na época de colheita dos frutos, tipo de solo, umidade, clima da região e o tipo de extração (SILVESTRES; PAULETTI, 2018; MILLEZI *et al.*, 2013). No estudo de Teixeira *et al.* (2017), os rendimentos médios variaram de 0,25%, encontrada na mexerica de umbigo a 1,29% encontrada na mexerica tardia da sicília, onde avaliou nove genótipos de mexericas (*Citrus deliciosa* Tenore) e tangerina (*Citrus reticulata* Blanco), aproximando-se ao resultado obtido no presente estudo.



**Figura 11.** Porcentagem de rendimento médio de óleo essencial de cascas de frutos imaturos e maduros de tangerinas enxertadas em limão Cravo. Médias seguidas de mesma letra (maiúsculas diferenciando entre variedades da mesma maturação e minúsculas diferenciando entre maturação dentro da mesma variedade) não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

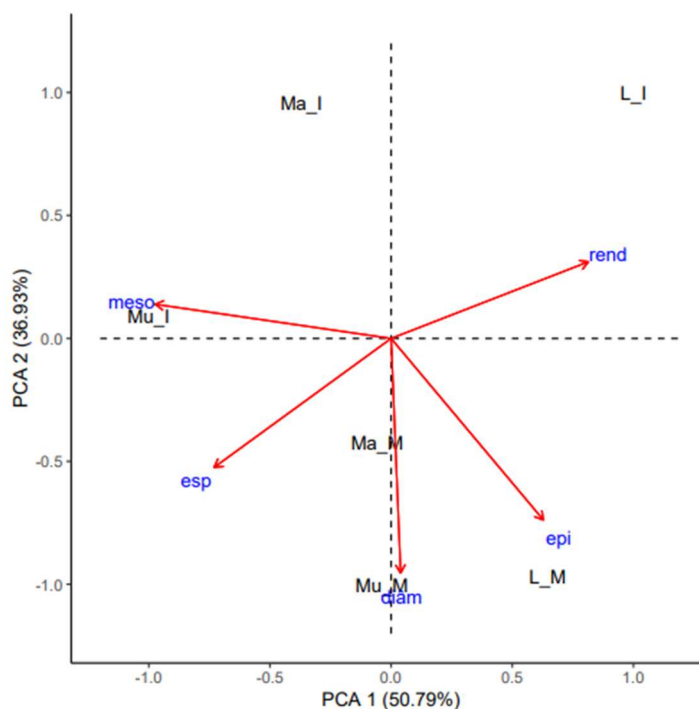
Tendo em vista esses resultados, calculou-se o coeficiente de Pearson com o intuito de correlacionar o fator rendimento de OE com a espessura das partes da casca das tangerinas (Tabela 2). Quando imaturo, demonstra-se que, quanto maior a espessura do epicarpo, maior o rendimento de OE, estabelecido pelos valores positivos da matriz, como evidenciado para a variedade de mexerica Late IAC 585. De maneira oposta a isso, mesmo possuindo uma espessura total e de mesocarpo relativamente maior, o rendimento será menor. Já em frutos maduros, como há uma redução do mesocarpo à medida que o fruto amadurece, a espessura total da casca passou a ter uma correlação positiva com o rendimento, sendo ela composta agora principalmente por epicarpo, que também apresentou uma correlação positiva

**Tabela 2.** Matriz de correlação de Pearson entre rendimento de óleo essencial e espessura de casca das tangerinas enxertadas em limão Cravo.

Fator	Coeficiente de correlação de Pearson					
	Imaturo			Maduro		
	Epicarpo	Mesocarpo	Espessura total	Epicarpo	Mesocarpo	Espessura total
<b>Rendimento</b>	0,91	-0,91	-0,71	0,83	-0,39	0,64

As características das variedades de tangerinas nos dois estágios de maturação foram usadas na análise de componentes principais (PCA). Foi possível identificar os componentes principais, na qual o componente principal 1 (CP1 = 50,79%) detém mais informação estatística que o componente principal 2 (CP2 = 36,93%), explicando 87,72% da variância total dos dados. As variáveis que mais

contribuíram com o CP1 foram rendimento e espessura do mesocarpo com valores de R de 0,81 e -0,97 respectivamente. Já para o CP2, diâmetro dos frutos foi a variável que mais contribuiu nessa dimensão, com R de -0,95 (Figura 12).



**Figura 12.** Análise de componentes principais (PCA) mostrando a distribuição de frutos de três variedades de tangerinas: tangor Murcott IAC 221 (Mu), mexerica Late IAC 585 (L) e tangerina IAC 2019Maria (Ma), em dois estágios: maduro (M) e imaturo (I) associados com as variáveis: rendimento de óleo essencial (rend), diâmetro de frutos (diam), espessura do epicarpo (epi), espessura do mesocarpo (meso) e espessura total da casca (esp).

A partir disso, pode-se observar que a mexerica Late IAC 585 imatura, apresentou um maior rendimento e uma menor espessura do mesocarpo. Em contradição, a tangor Murcott IAC 221 quando imatura apresentou menor rendimento e maior espessura de mesocarpo. Observa-se que a mexerica Late IAC 585 quando imatura apresentou o menor diâmetro de frutos e a tangor Murcott IAC 221 madura o maior diâmetro.

### 5.3. Composição dos óleos essenciais de tangerinas

A análise cromatográfica de GC-FID e GC-MS identificou no total 44 compostos, sendo 24 compostos para a variedade tangerina IAC 2019Maria imatura, 25 compostos para OEs de fruto maduro, 24 (verde) e 27 (maduro) para tangor Murcott IAC 221 e 28 (imaturo) e 26 (maduro) para mexerica Late IAC 585 (Tabela 3). Esses

resultados se aproximam ao que relata a literatura, onde foram encontrados desde 24 até 64 compostos nos OEs de diferentes variedades de tangerinas (YI *et al.*, 2018; SULZBACH *et al.*, 2023). Desses componentes, observa-se que os óleos são constituídos principalmente por monoterpenos (40,75%), a classe dos terpenos é a mais predominante e seus compostos podem atuar de forma isolada ou em sinergia (HOSSAIN *et al.*, 2016; NIKKHAH e HASHEMI, 2020; OuYang *et al.*, 2020), capazes de potencializar sua atividade biológica, o que lhes garante maior eficácia (HOSSAIN *et al.*, 2016). Dentre eles o limoneno se destaca como componente majoritário para todas as variedades de tangerinas, apresentando teores maiores quando extraídos de frutos maduros, consistente com o resultado de Denkova-Kostova (2021) de 84,88% de limoneno identificado em *C. reticulata* L. Para a mexerica Late IAC 585, o segundo componente com maior percentual é o  $\gamma$ -terpineno, com 19,71% para frutos imaturos e 18,89% para frutos maduros, teores que se aproximam ao encontrado no trabalho de Bourgou *et al.* (2012), onde concluíram que as cascas de tangerina imatura continham predominantemente monoterpenos como limoneno (65,37%) e  $\gamma$ -terpineno (12,44%), molécula caracterizada como anti-inflamatória e microbicida (RAMALHO *et al.*, 2015; RAMALHO *et al.*, 2016). Além desses compostos, o linalol apresentou teores relevantes, principalmente para a variedade IAC 2019Maria com 13,13% para frutos imaturos e 9,7% para frutos maduros.

**Tabela 3.** Composição química e porcentagem relativa de óleos essenciais de cascas de frutos imaturos (I) e maduros (M) de tangerinas enxertadas em limão Cravo.

Nome dos componentes	Porcentagem relativa (%)					
	Mexerica Late 585IAC		Tangerina IAC 2019Maria		Tangor Murcott IAC221	
	I	M	I	M	I	M
<b>Ácidos</b>						
Ácido benzóico	-	1,03	-	-	-	-
Ácido fórmico	-	-	-	0,06	-	-
<b>Álcoois</b>						
3,7-Dimethyloct-7-en-1-ol	-	-	-	0,41	-	-
9,12-Tetradecadien-1-ol	-	-	-	0,01	-	-
citronelol	0,34	0,20	0,34	0,45	0,59	0,14
Carveol	-	-	-	0,20	-	-
linalol	1,05	0,41	13,13	9,7	2,89	1,37
octanol	0,22	-	0,48	0,49	0,34	0,14
p-menth-2-en-1-ol	0,07	0,17	0,19	-	-	-

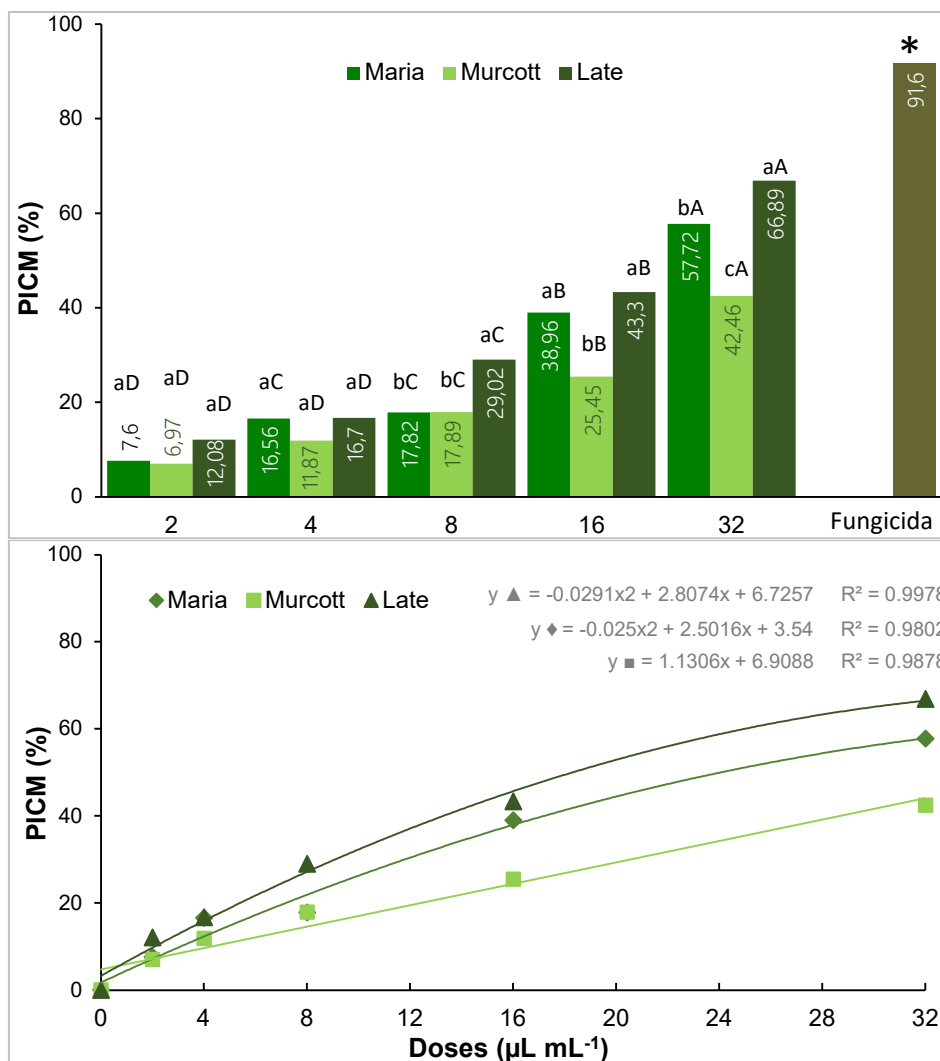
terpinen-4-ol	1,33	0,53	0,69	0,36	0,11	0,06
trans-p-mentha-dien-2-ol	-	-	0,07	0,17	0,19	0,06
$\alpha$ -Terpineol	2,65	1,06	1,03	0,71	0,61	0,21
<b>Aldeídos</b>						
Citronelal	0,08	0,07	0,37	0,45	0,32	0,30
Decanal	0,07	0,18	0,45	0,82	0,52	0,44
Nonanal	-	-	-	-	0,49	0,43
Neral	-	-	0,08	-	-	0,04
Octanal	0,29	-	1,30	1,60	1,01	0,59
Perillaldeído	0,29	0,15	0,15	0,18	0,18	-
<b>Cetonas</b>						
Cavona	-	-	-	-	0,03	-
<b>Monoterpenos</b>						
$\Delta$ -carene	0,75	0,55	0,15	-	0,02	0,02
1,3,6-Heptatriene, 2,5,5-trimethyl	-	-	-	-	0,02	-
1,3,8-p-Menthatriene	-	-	-	0,02	-	-
Bornanone	0,04	-	-	-	-	-
Carvacrol	0,32	-	-	-	-	-
Felandreno	0,15	0,11	-	0,01	-	0,13
Isoterpinoleno	1,30	1,12	0,09	0,04	0,02	0,03
Limoneno	58,89	66,19	77,17	80,5	88,77	90,8
p-Cymeno	2,39	2,06	-	-	-	0,04
Sabineno	0,27	0,30	0,66	0,87	0,24	0,54
Tujeno	0,79	0,74	0,04	-	-	-
$\alpha$ -Pineno	1,98	1,95	0,60	0,63	0,68	0,92
$\alpha$ -terpineno	-	-	-	0,12	-	-
$\beta$ -mirceno	1,89	2,03	2,13	2,06	2,50	2,79
$\beta$ -ocimeno	0,02	-	0,09	-	-	-
$\beta$ -pineno	1,75	1,47	0,07	0,07	0,04	0,08
$\gamma$ -terpineno	19,71	18,89	0,22	0,13	0,06	0,40
Canfeno	0,02	0,01	-	-	-	-
<b>Sesquiterpenos</b>						
Farneceno	-	0,12	-	-	-	0,11
Germacreno	-	-	-	-	0,07	0,03
Salinene	-	0,10	-	-	-	-
$\alpha$ -copaene	0,02	0,02	0,02	-	0,05	0,06
$\beta$ -cadinene	0,04	0,3	0,04	0,03	0,09	0,21
$\beta$ -Copaene	-	-	-	-	-	0,02

A porcentagem de componentes químicos varia de acordo com a localização, clima, precipitação, altitude e etc., decorrente disso, as atividades biológicas e química dos OEs são altamente dependentes desses componentes encontrados. Os

ingredientes ativos como limoneno,  $\gamma$ -pineno e  $\gamma$ -mirceno são utilizados como antissépticos e anestésicos locais, tanto na indústria alimentícia como na de cosméticos e medicamentos (BAKKALI *et al.*, 2008).

#### **5.4. Inibição *in vitro* do fungo *C. abscissum***

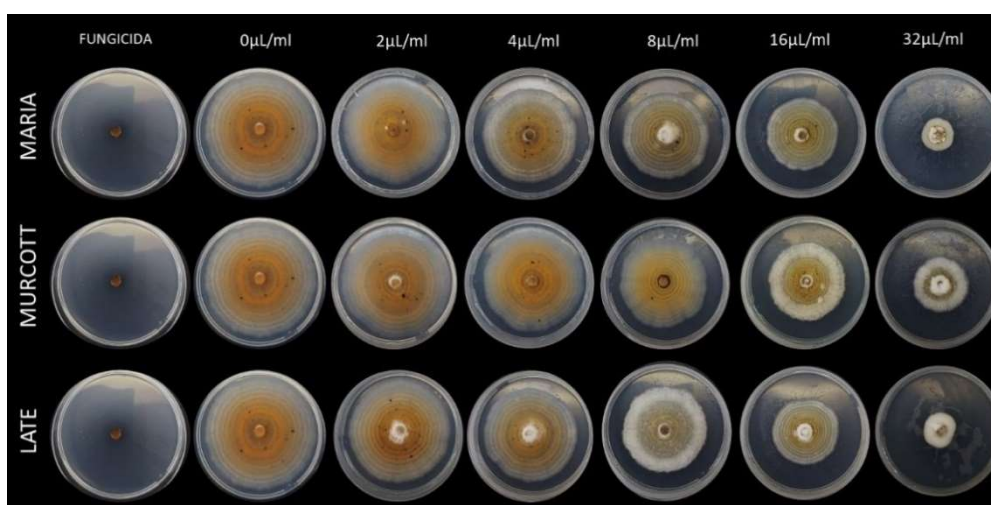
Com base nos resultados da análise do crescimento micelial, foi possível calcular a taxa de inibição. Observou-se que todos os tratamentos apresentaram diferenças significativas em relação ao controle positivo (trifloxistrobina ( $100 \text{ g L}^{-1}$ ) + tebuconazol ( $200 \text{ g L}^{-1}$ )), que teve uma taxa de inibição de 91,6%. Ao analisar os extratos de OEs obtidos de frutos imaturos, foi constatado que a mexerica Late IAC 585 proporcionou a maior taxa de inibição a partir da dose de  $8 \mu\text{L mL}^{-1}$ , sendo igualada pela tangerina IAC 2019 Maria na dose de  $16 \mu\text{L mL}^{-1}$  (Figura 13). Na dosagem  $32 \mu\text{L mL}^{-1}$ , todas as variedades se diferenciaram entre si, com a mexerica Late IAC 585 apresentando uma inibição de 66,89%, seguida da tangerina IAC 2019Maria com 57,72% e tangor Murcott IAC 221 com menor desempenho (42,46%). Ao considerar apenas as doses testadas, mostradas na regressão, fica evidente que quanto maior a concentração do OE, maior é a inibição do crescimento fúngico, observando-se altas taxas na dose de  $32 \mu\text{L mL}^{-1}$ , que se diferenciaram significativamente das demais doses (Figura 13 e 14).



**Figura 13.** Porcentagem de inibição do crescimento micelial (PICM) de *C. abscissum*, *in vitro*, em diferentes doses (0, 2, 4, 8, 16 e 32 µL mL<sup>-1</sup>) de óleo essencial de casca de três variedades de tangerinas extraídos de frutos imaturo, junto ao fungicida comercial (trifloxistrobina (100 g L<sup>-1</sup>) + tebuconazol (200 g L<sup>-1</sup>)). Médias seguidas de mesma letra (maiúsculas diferenciando entre doses da mesma variedade e minúsculas diferenciando entre as variedades dentro da mesma dose) não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. “\*” = diferiu significativamente das demais.

Essa atividade antifúngica pode estar ligada a capacidade de alterações na composição, permeabilidade e integridade das membranas celulares presentes nos fungos, provocando inibição de processos intracelulares de transporte de íons, estresse oxidativo e ruptura das membranas celulares (NAZZARO *et al.*, 2017). De Azevedo (2020) ao testar OE puro de tangerina frente ao *C. gloesporioides*, observou uma inibição de 55,9%. Quando aplicado sobre *A. terreus* e *Fusarium culmorum*, o OE de casca de *C. sinensis* inibiu em 100% o crescimento micelial na dosagem 50 µL mL<sup>-1</sup> (ELGAT *et al.*, 2020). Devite *et al.* (2023) demonstrou resultado semelhante obtido com a tangerina IAC 2019Maria, a qual apresentou os melhores resultados na inibição fúngica, fato que pode estar relacionado devido a maior concentração de

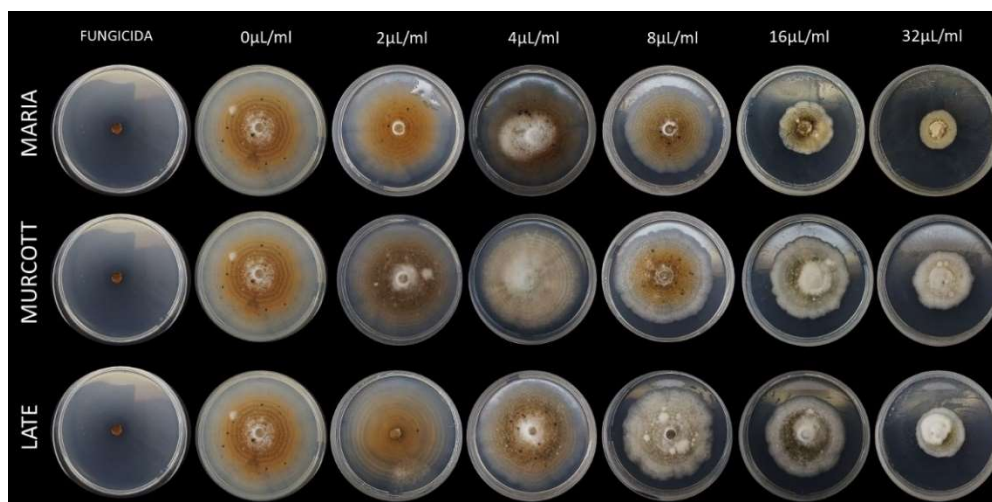
isocarveol (álcool perílico), juntamente com a presença de limoneno e linalol na composição de seu OE. Além da ação do limoneno, outros compostos podem estar provocando a inibição. O  $\gamma$ -terpineno é responsável pelo vazamento de proteínas e lipídios em fungos (TAHVILIAN, 2016), composto encontrado em altas taxas no OE da mexerica Late IAC 585. Há estudos que mostram que outros compostos como o  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -pinene, apresentam atividade antifúngica contra diferentes espécies de fungos, possivelmente pela interferência com enzimas fúngicas da parede celular (DE MACÊDO ANDRADE *et al.*, 2018).



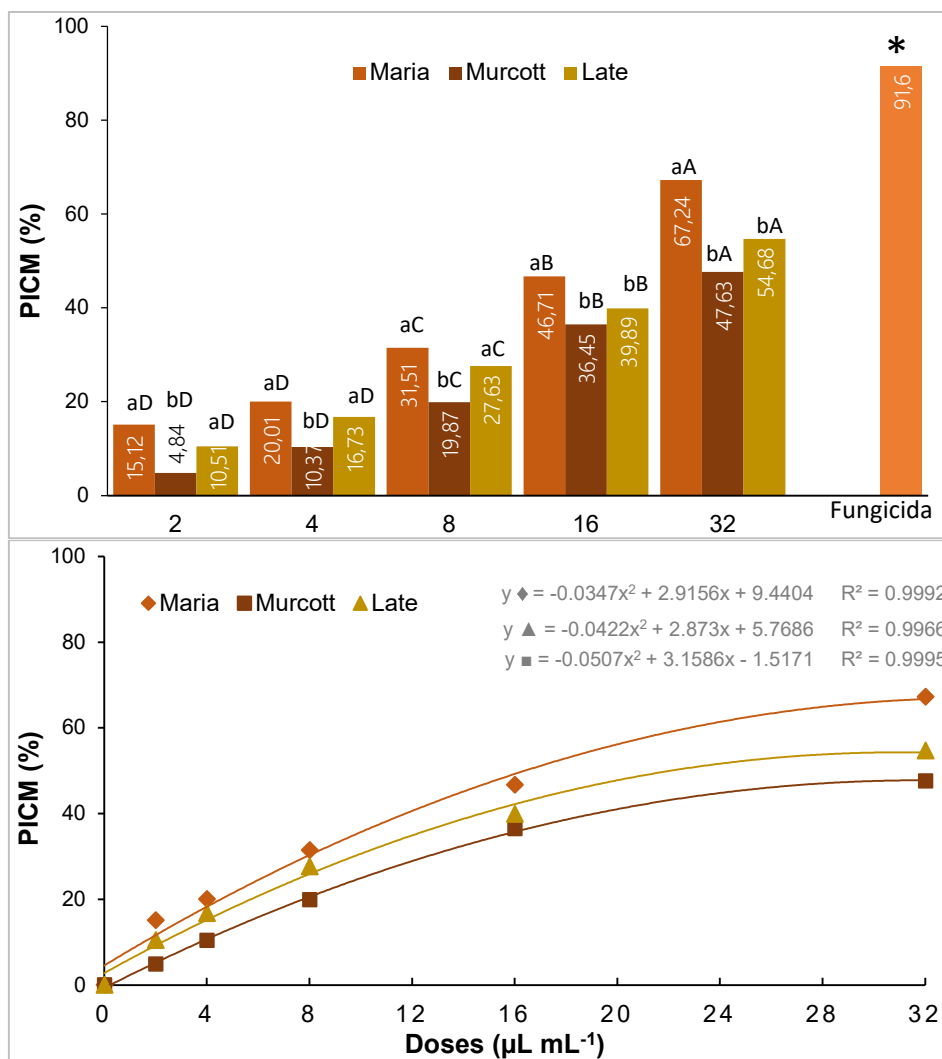
**Figura 14.** Representação visual do crescimento micelial, *in vitro*, de *C. abscissum* sob diferentes doses (0, 2, 4, 8, 16 e 32 ( $\mu\text{L mL}^{-1}$ ) de OEs de tangerinas extraídos de frutos imaturos comparadas ao fungicida comercial (trifloxistrobina ( $100 \text{ g L}^{-1}$ ) + tebuconazol ( $200 \text{ g L}^{-1}$ )). Fonte: autor

Ao utilizar o OE extraído dos frutos maduros, também é possível observar a diminuição no crescimento micelial conforme as dosagens aumentam (Figura 15). No entanto, há um comportamento diferente entre as variedades, onde a tangerina IAC 2019Maria se destaca com uma maior porcentagem de inibição (67,24%) na maior dosagem. Isso só é observado a partir da dosagem de  $16 \mu\text{L mL}^{-1}$ , quando começa a se distinguir das demais variedades (Figura 16). A porcentagem de inibição de 4,48% do tratamento com  $2 \mu\text{L mL}^{-1}$  do OE da tangerina Murcott IAC 221 foi estatisticamente igual à dosagem  $0 \mu\text{L mL}^{-1}$ , o que não resultou em percentual de controle. No trabalho de Dias *et al.* (2020) com OE da casca de *C. sinensis* com seu principal composto de limoneno (98,54%) foi observado potencial de inibição do crescimento micelial (63,46%) de *S. sclerotiorum*. Outros compostos podem apresentar atividades antifúngicas e capacidade de inibir o crescimento do patógeno, ocasionando essa

diferença nos resultados à medida que os compostos variam entre as diferentes variedades de tangerinas.

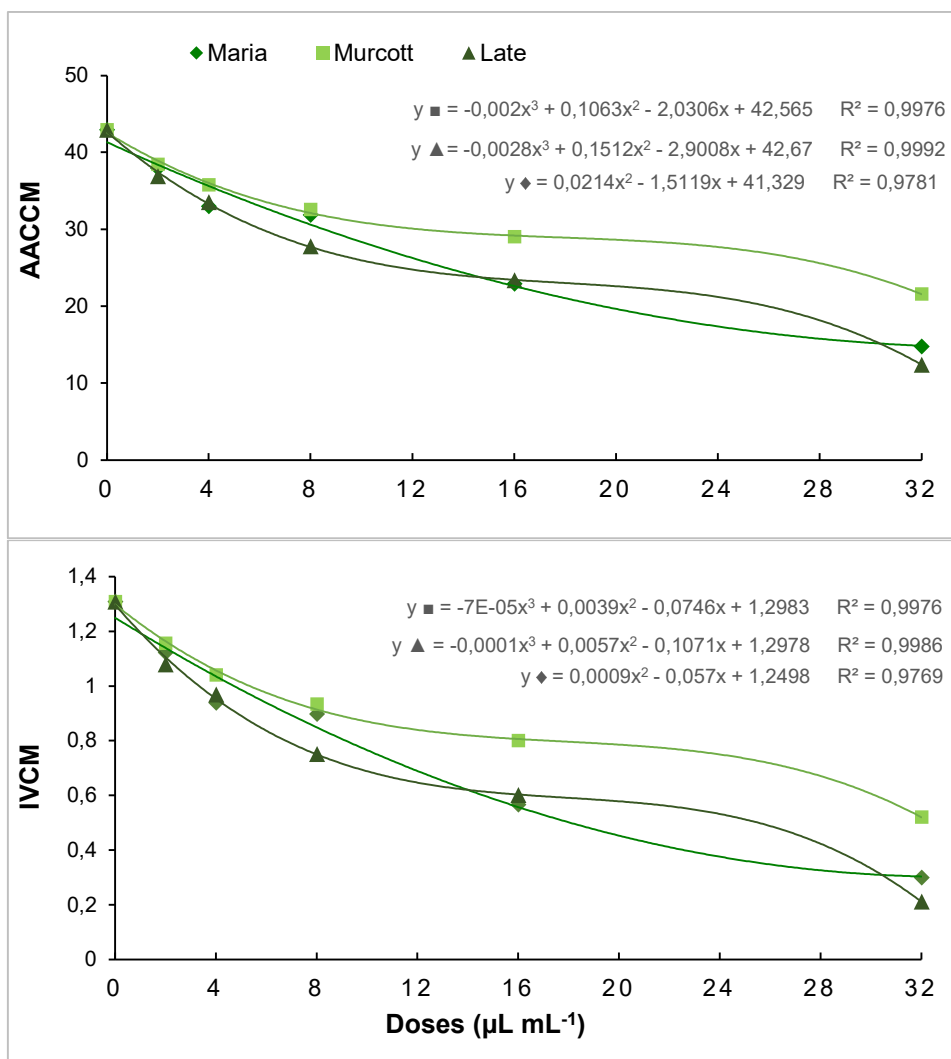


**Figura 15.** Representação visual do crescimento micelial, *in vitro*, de *C. abscissum* sob diferentes doses (0, 2, 4, 8, 16 e 32 ( $\mu\text{L mL}^{-1}$ ) de OEs de tangerinas extraídos de frutos maduros comparadas ao fungicida comercial (trifloxistrobina ( $100 \text{ g L}^{-1}$ ) + tebuconazol ( $200 \text{ g L}^{-1}$ )) Fonte: autor



**Figura 16.** Porcentagem de inibição do crescimento micelial (PICM) de *C. abscessum*, *in vitro*, em diferentes doses (0, 2, 4, 8, 16 e 32  $\mu\text{L mL}^{-1}$ ) de OE da casca de três variedades de tangerinas extraídos de frutos maduros, junto ao fungicida comercial (trifloxistrobina ( $100 \text{ g L}^{-1}$ ) + tebuconazol ( $200 \text{ g L}^{-1}$ )). Médias seguidas de mesma letra (maiúsculas diferenciando entre doses da mesma variedade e minúsculas diferenciando entre as variedades dentro da mesma dose) não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. “\*” = diferiu significativamente das demais

De maneira oposta, o índice de velocidade e área abaixo da curva de crescimento micelial, fatores que, reduziram-se à medida que as concentrações dos óleos aumentaram (Figura 17). Para os OEs extraídos de frutos imaturos, quando utilizada a dosagem 4 e 16  $\mu\text{L mL}^{-1}$  tanto o OE da tangerina IAC 2019Maria como a mexerica Late IAC 585 tiveram o menor IVCM e AACCM, não diferindo estatisticamente entre si, o que não foi observado ao se utilizar a dosagem 8 e 32  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , onde o tratamento com OE de mexerica Late IAC 585 manteve o melhor controle do patógeno (Tabela 4). Todos os tratamentos diferiram da testemunha positiva. Para todas as variedades a maior concentração de OE atingiu o melhor controle do crescimento micelial diferindo das demais dosagens.



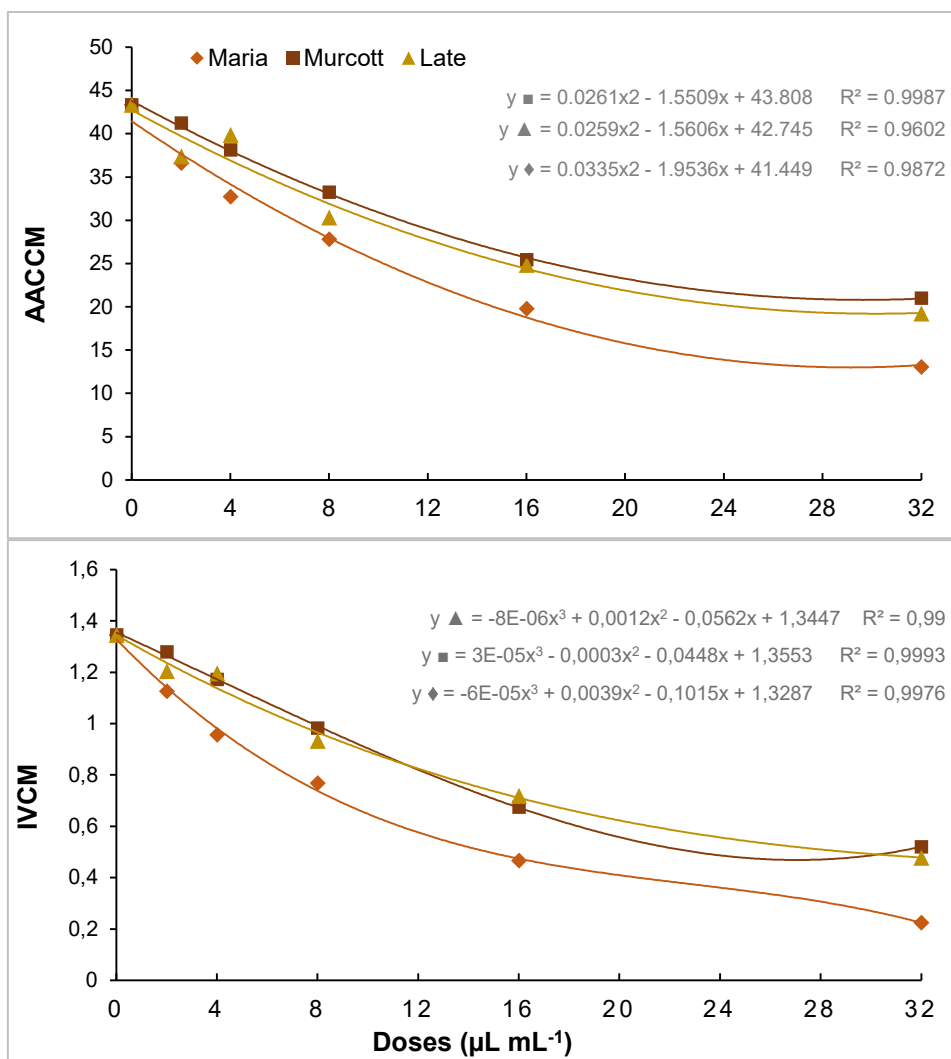
**Figura 17.** Índice de velocidade e área abaixo da curva do crescimento micelial do *C. abscissum*, *in vitro*, sob diferentes doses (0, 2, 4, 8, 16 e 32 ( $\mu\text{L mL}^{-1}$ ) de OEs de três variedades de tangerinas extraídos de frutos imaturos.

**Tabela 4.** Índice de velocidade e área abaixo da curva do crescimento micelial do *C. abscissum*, *in vitro*, sob diferentes doses (0, 2, 4, 8, 16 e 32 ( $\mu\text{L mL}^{-1}$ ) de OEs de três variedades de tangerinas extraídos de frutos imaturos

VARIEDADES	Doses ( $\mu\text{L mL}^{-1}$ )					
	0	2	4	8	16	32
<b>IVCM</b>						
<b>Tangor Murcott IAC221</b>	1,30 Aa*	1,15 Ba*	1,04 Ca*	0,93 Da*	0,80 Ea*	0,52 Fa*
<b>Tangerina IAC 2019Maria</b>	1,30 Aa*	1,12 Ba*	0,93 Cb*	0,89 Da*	0,56 Eb*	0,30 Fb*
<b>Mexerica Late IAC 585</b>	1,30 Aa*	1,07 Ba*	0,96 Cb*	0,75 Db*	0,60 Eb*	0,21 Fc*
<b>Fungicida</b>	0					
<b>AACCM</b>						
<b>Tangor Murcott IAC221</b>	42,9 Aa*	38,4 Ba*	35,8 Ca*	32,5 Da*	29,0 Ea*	21,6 Fa*
<b>Tangerina IAC 2019Maria</b>	42,9 Aa*	37,9 Ba*	33,0 Cb*	31,9 Ca*	22,9 Db*	14,7 Eb*
<b>Mexerica Late IAC 585</b>	42,9 Aa*	36,9 Ba*	33,5 Cb*	27,8 Db*	23,4 Eb*	12,4 Fc*
<b>Fungicida</b>	6,6					

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na horizontal e da mesma letra minúscula na vertical não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. CV = 10,44% e 7,76%. “\*\*” diferem da testemunha positiva (fungicida).

Já para OEs de frutos maduros o cenário muda em relação ao imaturo, mantendo os resultados semelhante ao encontrado na PICM, na qual a tangerina IAC 2019Maria proporciona menor índice de velocidade do crescimento micelial (Figura 18) tratamento no qual diferiu estatisticamente das demais variedades em todas as dosagens utilizadas, sendo a de melhor controle a dosagem 32  $\mu\text{L mL}^{-1}$  (Tabela 5). Isso pode ser explicado pela presença de componentes como o limoneno, linalol e mirceno que possuem capacidade inibitória de crescimento micelial e na germinação de esporos de espécies de *C. acutatum* (BRAND, 2012), componentes no qual foram encontrados em altas taxas na tangerina IAC 2019Maria. O grupo hidroxila no linalol favorece a penetração do linalol através da membrana citoplasmática, representando assim uma atividade antifúngica relativamente boa em comparação aos monoterpenos p-cimeno e  $\gamma$ -terpineno (QI *et al.*, 2023). Por meio dos resultados alcançados neste estudo, é evidente o impacto dos OEs no desenvolvimento do patógeno, independentemente da variedade e do estágio de maturação da fruta utilizada. Além disso, outro fato que se confirma é que, à medida que as doses aumentam, tanto para as variedades quanto para as variáveis analisadas, há uma maior restrição na atividade micelial do fungo.



**Figura 18.** Índice de velocidade e área abaixo da curva do crescimento micelial do *C. acutatum*, *in vitro*, sob diferentes doses (0, 2, 4, 8, 16 e 32 (µL mL<sup>-1</sup>) de OEs de três variedades de tangerinas extraídos de frutos maduros.

**Tabela 5.** Índice de velocidade e área abaixo da curva do crescimento micelial do *C. acutatum*, *in vitro*, sob diferentes doses (0, 2, 4, 8, 16 e 32 ( $\mu\text{L mL}^{-1}$ ) de OEs de três variedades de tangerinas extraídos de frutos maduros.

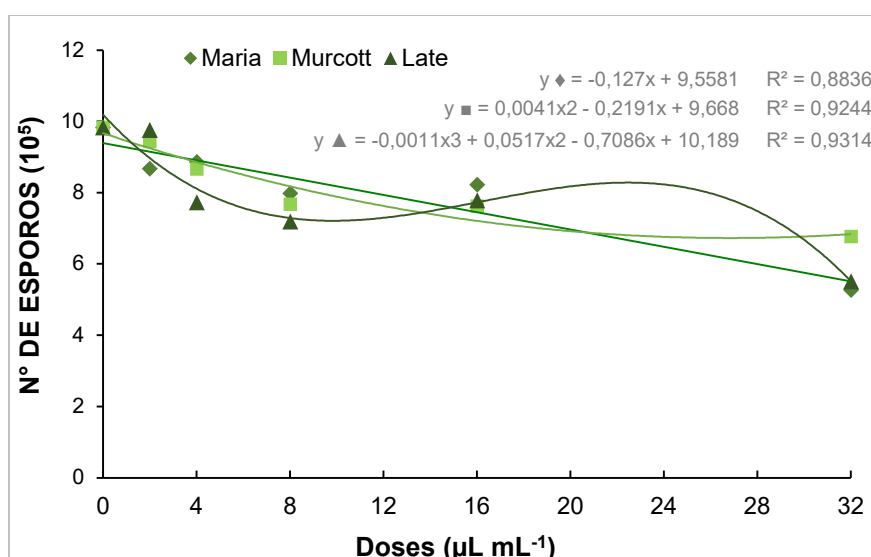
VARIEDADES	Doses ( $\mu\text{L mL}^{-1}$ )					
	0	2	4	8	16	32
<b>IVCM</b>						
<b>Tangor Murcott IA C221</b>	1,34 Aa*	1,28 Aa*	1,19 Ba*	0,98 Ca*	0,71 Da*	0,52 Ea*
<b>Mexerica Late IAC 585</b>	1,34 Aa*	1,20 Ba*	1,17 Ba*	0,93 Ca*	0,67 Da*	0,47 Ea*
<b>Tangerina IAC 2019Maria</b>	1,34 Aa*	1,12 Bb*	0,95 Cb*	0,76 Db*	0,46 Eb*	0,22 Fb*
<b>Fungicida</b>	0					
<b>AACCM</b>						
<b>Tangor Murcott IAC 221</b>	43,3 Aa*	41,2 Aa*	38,1 Ba*	33,2 Ca*	25,4 Da*	21,0 Ea*
<b>Mexerica Late IAC 585</b>	43,3 Aa*	37,4 Ba*	39,8 Ba*	30,3 Cb*	24,8 Da*	19,2 Ea*
<b>Tangerina IAC 2019Maria</b>	43,3 Aa*	36,6 Bb*	32,7 Cb*	27,8 Db*	19,7 Eb*	13,0 Fb*
<b>Fungicida</b>	6,6					

Médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott em 5% de probabilidade. CV = 13,37% e 15,01%. “\*” diferem da testemunha positiva (fungicida).

Essa ação dos OEs vem sendo investigada com o passar dos anos. Cebi e Erarslan (2023) em seu estudo com *A. niger* e *P. expansum*, observaram um crescimento mais fraco à medida que se aumentou a concentração (5, 10, 15, 20  $\mu\text{L/placa}$  de petri) de OE de *C. bergamia*, além de interromperem a germinação de esporos dos patógenos. Ao testar com *C. gloesporioides*, os OEs de *Aloysia citriodora*, *Cymbopogon winterianus*, *Lippia alba* e *Ocimum americanum*, inibiram em 100% o seu crescimento micelial *in vitro* quando submetido a dosagem 1,2  $\text{mL L}^{-1}$  (FONTANA *et al.*, 2021). Ao tentar descobrir a ação dos OE na estrutura dos fungos Oliveira *et al.* (2019), relataram mudanças na superfície de *C. acutatum* quando submetido ao óleo de *Lippia sidoides*, como rugas superficiais nas hifas do fungo, além de descamação, distorção e sua destruição, tornando-os inviáveis. Para ensaios *in vivo*, o OE da variedade Sanh (*C. reticulata* x *C. sinensis*) inibiu cerca de 49% da doença causada por *C. gloesporioides* quando aplicado na concentração de 16% v/v em mangas (DUONG *et al.*, 2023). Devite *et al.*, (2023) apresentou resultados promissores na dose de 16  $\mu\text{L mL}^{-1}$  de OE da tangerina IAC2019 Maria para controle do fungo *Alternaria alternata in vitro*. Há ainda muito que se estudar sobre essa ação dos OEs principalmente de variedades de tangerina, sabe-se que essa atividade depende diretamente da presença de determinados componentes e sua quantidade

encontrada (ANTUNES; CAVACO, 2010), para isso são necessários estudos em diferentes concentrações para diversos fungos a fim de se obter um efeito expressivo.

Como demonstrado na Figura 19, ao aplicar a maior dosagem ( $32 \mu\text{L mL}^{-1}$ ) do OE da tangerina IAC 2019Maria, houve uma redução de aproximadamente 46,3% da produção de esporos, quando comparada com a dosagem  $0 \mu\text{L mL}^{-1}$ , se igualando estatisticamente com a mexerica Late IAC 585, variedade na qual se diferencia das demais na dosagem  $4 \mu\text{L mL}^{-1}$ , com menor número de esporos (Tabela 6). Resultado similar foi encontrado por Chutia *et al.* (2009) onde o OE de tangerina foi eficaz na redução da produção de esporos dos fungos *A. alternata*, *Rhizoctonia solani*, *Curvularia lunata*, *F. oxysporum* e *Helminthosporium oryzae*. Fato não ocorrido tangor Murcott IAC 221 que mesmo na maior dosagem, teve ação semelhante ao encontrado nas dosagens 8 e  $16 \mu\text{L mL}^{-1}$ , com uma taxa ainda alta de esporos. Todos os tratamentos se diferenciaram da testemunha positiva (fungicida). Para os OEs de frutos maduros, constatou-se diferença significativa somente entre as doses dentro de cada variedade. Houve também uma diminuição de esporos com o aumento da concentração (Figura 20), principalmente com o OE da Late IAC 585 onde a dosagem  $32 \mu\text{L mL}^{-1}$  diferiu das demais doses, com uma redução de 55,3% quando comparada com a dose  $0 \mu\text{L mL}^{-1}$ . Para a variedade tangor Murcott IAC 221 as doses 2, 4, 8, 16 e  $32 \mu\text{L mL}^{-1}$  se igualaram (Tabela 7).

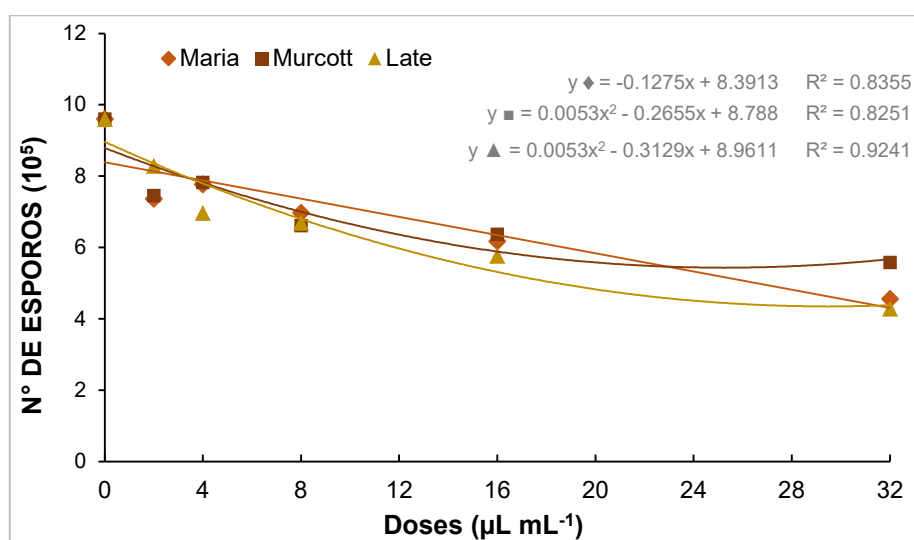


**Figura 19.** Contagem de esporos ( $10^5$ ) por mL de suspensão de *C. abscissum*, *in vitro*, sob diferentes doses (0, 2, 4, 8, 16 e  $32 \mu\text{L mL}^{-1}$ ) de OEs de três variedades de tangerinas extraídos de frutos imaturos

**Tabela 6.** Contagem de esporos ( $10^5$ ) por mL de suspensão de *C. abscissum*, *in vitro*, sob diferentes doses (0, 2, 4, 8, 16 e 32 ( $\mu\text{L mL}^{-1}$ ) de OEs de três variedades de tangerinas extraídos de frutos imaturos.

VARIEDADES	Doses ( $\mu\text{L mL}^{-1}$ )					
	0	2	4	8	16	32
<b>Tangor Murcott IAC 221</b>	9,82 Aa*	9,43 Aa*	8,66 Aa*	7,67 Ba*	7,62 Ba*	6,76 Ba*
<b>Tangerina IAC 2019Maria</b>	9,82 Aa*	8,67 Ba*	8,86 Ba*	7,97 Ba*	8,22 Ba*	5,27 Cb*
<b>Mexerica Late 585 IAC</b>	9,82 Aa*	9,76 Aa*	7,72 Bb*	7,19 Ba*	7,77 Ba*	5,51 Cb*
<b>Fungicida</b>	0					

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na horizontal e da mesma letra minúscula na vertical não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. CV = 16,47%. “\*\*\*” diferem da testemunha positiva (fungicida).



**Figura 20.** Contagem de esporos ( $10^5$ ) por mL de suspensão de *C. acutatum*, *in vitro*, sob diferentes doses (0, 2, 4, 8, 16 e 32 ( $\mu\text{L mL}^{-1}$ ) de OEs de três variedades de tangerinas extraídos de frutos maduros.

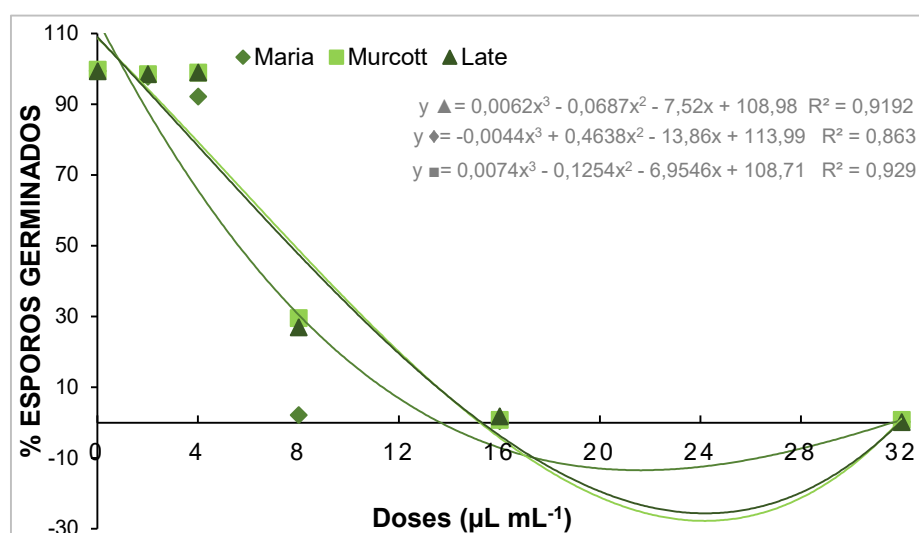
**Tabela 7.** Contagem de esporos ( $10^5$ ) por mL de suspensão de *C. acutatum*, *in vitro*, sob diferentes doses (0, 2, 4, 8, 16 e 32 ( $\mu\text{L mL}^{-1}$ ) de OEs de três variedades de tangerinas extraídos de frutos maduros.

VARIEDADES	Doses ( $\mu\text{L mL}^{-1}$ )					
	0	2	4	8	16	32
<b>Tangor Murcott IAC 221</b>	9,59 Aa*	7,45 Ba*	7,82 Ba*	6,60 Ba*	6,36 Ba*	5,58 Ba*
<b>Tangerina IAC 2019Maria</b>	9,59 Aa*	7,36 Ba*	7,76 Ba*	6,97 Ba*	6,17 Ca*	4,55 Ca*
<b>Mexerica Late 585 IAC</b>	9,59 Aa*	8,28 Aa*	6,97 Ba*	6,69 Ba*	5,76 Ba*	4,28 Ca*
<b>Fungicida</b>	0					

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na horizontal e da mesma letra minúscula na vertical não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. CV = 27,4%. “\*\*\*” diferem da testemunha positiva (fungicida).

### 5.4.1. Germinação de conídios do *C. abscissum*

Ao testar os OEs de frutos imaturos e maduros sobre a germinação de conídios, fica nítido que com o aumento das dosagens, o número de esporos germinados e diminuiram gradativamente (Figura 21 e 22). Em ambos os casos, o OE da tangerina IAC 2019Maria se destaca por começar seu controle em dosagens menores, se diferenciando das demais variedades. Para OEs de frutos imaturos, na dosagem 8  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , a tangerina IAC 2019Maria já reduziu em aproximadamente 98% quando comparada com a dosagem 0  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , restando apenas 2,1% de esporos germinados, obtendo a mesma inibição do fungicida (Tabela 8).



**Figura 21.** Porcentagem de esporos germinados de *C. abscissum*, *in vitro*, sob diferentes doses (0, 2, 4, 8, 16 e 32  $\mu\text{L mL}^{-1}$ ) de OEs de três variedades de tangerinas extraídos de frutos imaturos.

**Tabela 8.** Porcentagem de esporos germinados de *C. abscissum*, *in vitro*, sob diferentes doses (0, 2, 4, 8, 16 e 32  $\mu\text{L mL}^{-1}$ ) de OEs de três variedades de tangerinas extraídos de frutos imaturos.

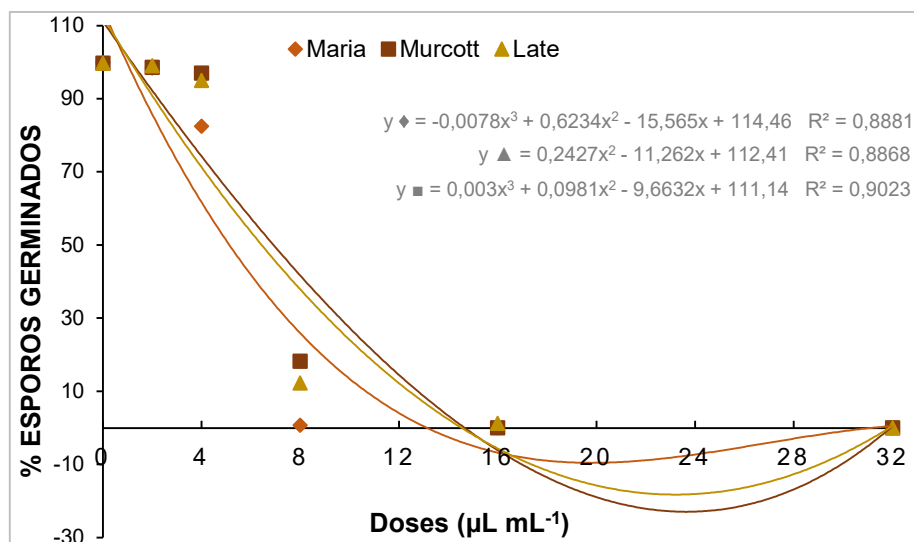
VARIEDADES	Doses ( $\mu\text{L mL}^{-1}$ )					
	0	2	4	8	16	32
<b>Tangor Murcott IAC 221</b>	99,7 Aa*	98,5 Aa*	98,9 Aa*	29,5 Ba*	0,7 Ca <sup>ns</sup>	0,7 Ca <sup>ns</sup>
<b>Tangerina IAC 2019Maria</b>	99,4 Aa*	97,7 Aa*	92,1 Aa*	2,1 Bb <sup>ns</sup>	0,4 Ba <sup>ns</sup>	0,2 Ba <sup>ns</sup>
<b>Mexerica Late 585 IAC</b>	99,2 Aa*	98,5 Aa*	98,9 Aa*	26,9 Ba*	1,7 Ca <sup>ns</sup>	0,1 Ca <sup>ns</sup>
<b>Fungicida</b>	6,75					

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na horizontal e da mesma letra minúscula na vertical não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. CV = 14,7%. “\*\*” diferem do fungicida. “ns” = se igualam ao fungicida.

Essa inibição precoce do OE da tangerina IAC 2019Maria, pode estar relacionada por ser a única variedade apresentar altas taxas de linalol (Tabela 3),

como já mencionado anteriormente, além da sua atividade na inibição do crescimento micelial, estudos mostram que o linalol possui efeito sobre a germinação de esporos, mesmo em dose baixa (2  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ), ele foi capaz de inibir completamente a germinação de esporos de *A. flavus* (LI *et al.*, 2022). Para OEs de frutos maduros, observou-se o mesmo cenário, porém a tangerina IAC 2019Maria começa a se diferenciar na dosagem 4  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , com uma redução acentuada ao utilizar a dosagem 8  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , se igualando significativamente com a ação do fungicida e com as maiores doses (Tabela 9). Quando utilizada a dosagem 32  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , para todas as variedades não houve germinação de esporos, se igualando estatisticamente com a dosagem 16  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , tanto para OEs de frutos imaturos, como maduros (Tabela 8 e 9). Resultado semelhante foi encontrado no estudo de Moura *et al.* (2017) ao utilizar a concentração de 1 e 2%, os OEs de laranja doce (*C. sinensis*) e limão siciliano (*C. limon*) inibiram totalmente a germinação dos esporos de *Colletotrichum musae* e *C. gloeosporioides*. Em baixas concentrações o OE de *C. limon* foi eficiente sobre a germinação de *C. gloeosporioides*.

No trabalho de Jiang *et al.* (2023) foi constatado que ao utilizar OE de lúpulo, houve não só a inibição do crescimento micelial, como também da germinação de esporos de isolados de *F. graminearum* devido a capacidade do OE em alterar o lipídio total, o conteúdo de quitina na membrana celular externa, bem como prejudicar a permeabilidade da membrana citoplasmática. O óleo de capim santo (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf.) inibiu completamente a germinação de conídios de *C. gloeosporioides* a partir da concentração de 3  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , outros óleos como de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) e alfavaca cravo (*Ocimum gratissimum* L.) inibiram a germinação a partir da concentração de 5  $\mu\text{L mL}^{-1}$  (AQUINO *et al.*, 2014). Essa ação dos OEs em impedir a germinação de esporos está relacionada aos compostos bioativos lipofílicos, os quais possuem facilidade em penetrar na bicamada lipídica da membrana celular do fungo e conseqüentemente causar uma ruptura (LAMBERT *et al.*, 2001; ULTEE *et al.*, 2000; SHARMA *et al.*, 2017)



**Figura 22.** Porcentagem de esporos germinados de *C. abscissum*, *in vitro*, sob diferentes doses (0, 2, 4, 8, 16 e 32 ( $\mu\text{L mL}^{-1}$ ) de OEs de três variedades de tangerinas extraídos de frutos maduros.

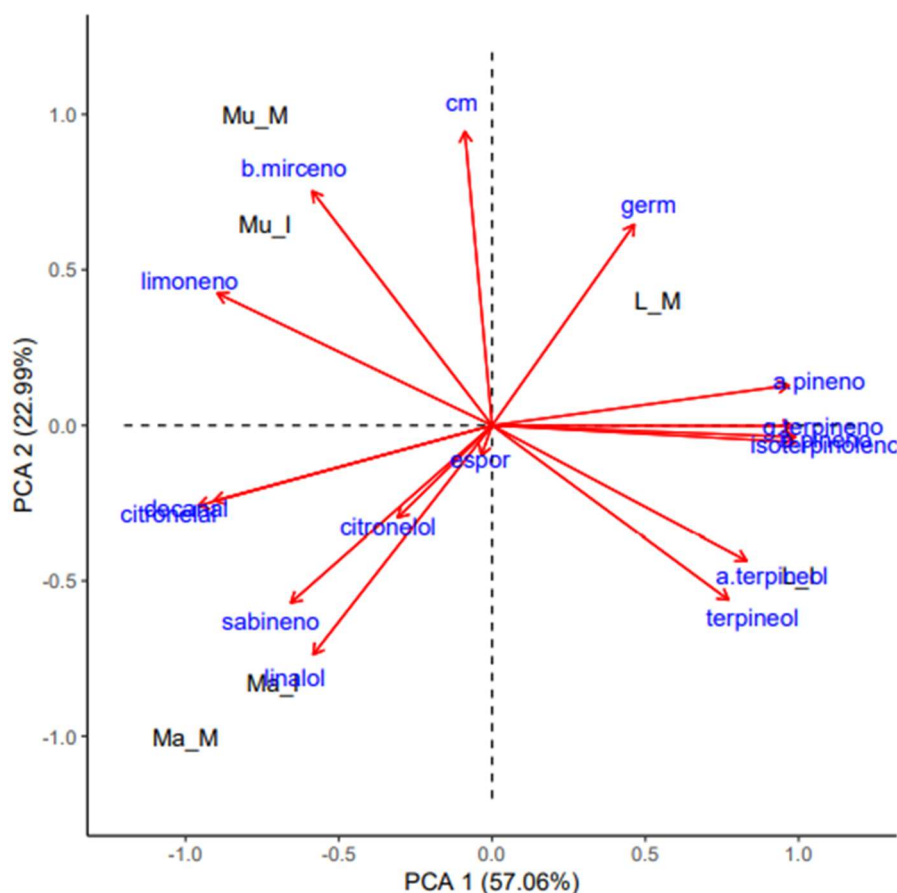
**Tabela 9.** Porcentagem de esporos germinados de *C. abscissum*, *in vitro*, sob diferentes doses (0, 2, 4, 8, 16 e 32 ( $\mu\text{L mL}^{-1}$ ) de OEs de três variedades de tangerinas extraídos de frutos maduros.

VARIEDADES	Doses ( $\mu\text{L mL}^{-1}$ )					
	0	2	4	8	16	32
<b>Tangor Murcott IAC 221</b>	99,7 Aa*	98,6 Aa*	97,0 Aa*	18,2 Ba*	0,0 Ca <sup>ns</sup>	0,0 Ca <sup>ns</sup>
<b>Tangerina IAC 2019Maria</b>	99,9 Aa*	98,4 Aa*	82,5 Bb*	0,7 Cb <sup>ns</sup>	0,0 Ca <sup>ns</sup>	0,0 Ca <sup>ns</sup>
<b>Mexerica Late 585 IAC</b>	99,7 Aa*	99,0 Aa*	95,0 Ba*	12,2 Cc*	1,2 Da <sup>ns</sup>	0,0 Da <sup>ns</sup>
<b>Fungicida</b>	1,12					

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na horizontal e da mesma letra minúscula na vertical não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. CV = 4,9%. “\*” diferem da testemunha positiva (fungicida). “ns” = se igualam ao fungicida.

As variedades de tangerinas nos dois estágios de maturação foram usadas na análise de componentes principais (PCA) para distinguir as variedades quanto aos componentes encontrados nos OEs extraídos dos frutos junto a sua atividade no controle do crescimento micelial (cm), esporulação (espor) e germinação de conídios (germ) do *C. abscissum in vitro*. A análise dos dois principais componentes explicou 80,05% da variância total dos dados, sendo o componente principal 1 (CP1 = 57,06%) que compreendeu a maior parte, seguido do componente principal 2 (CP2 = 22,99%).

O CP1 mostrou uma forte correlação com as quantidades de compostos como o citronelal (R= -0,95), decanal (R= -0,90), isoterpinoleno (R= 0,98),  $\alpha$ -pineno (OR= 0,96),  $\beta$ -pineno (R= 0,98),  $\gamma$ -terpineno (R= 0,98), limoneno (R= -0,89) e  $\alpha$ -terpineol (R= 0,83). A variável crescimento micelial (R= 0,94) foi o que mais contribuiu para o CP2 (Figura 23).



**Figura 23.** Análise de componentes principais (PCA) mostrando a distribuição dos óleos essenciais de frutos imaturos (I) e maduros (M) de três variedades de tangerinas: tangor Murcott IAC 221 (Mu), mexerica Late IAC 585 (L) e tangerina IAC 2019Maria (Ma), associados aos seus componentes químicos, crescimento micelial (cm), esporulação (espor) e germinação de conídios (germ) do *C. absicissum in vitro*.

Diante dos resultados, entende-se que o OE extraído da tangerina IAC 2019Maria quando madura, apresentou maiores teores de citronelal, decanal quando comparado com outros compostos como o isoterpinoleno,  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno,  $\gamma$ -terpineno e  $\alpha$ -terpineol, encontrados em quantidades menores, ao contrário do OE da mexerica Late 585 IAC que apresentou teores mais altos desses compostos. Em relação ao crescimento micelial, observa-se que OE da tangerina IAC 2019Maria apresentou a maior inibição e a tangor Murcott IAC 221 um pior desempenho no controle do crescimento micelial (Figura 23). Com essa análise observa-se de maneira mais detalhada, a correlação dos compostos químicos encontrados nos OEs com a sua capacidade em controlar o patógeno.

### 5.5. Controle da PFC em flores destacadas

Quando aplicados em flores destacadas, os OEs das três variedades de tangerinas não controlaram a doença, com alta incidência de sintomas (Figura 24), e diferiram estatisticamente somente do fungicida comercial que apresentou menor incidência da doença nas pétalas (Tabela 10). Essa porcentagem de sintomas encontradas nas flores tratadas com o fungicida pode ser explicada devido ao estágio fenológico das flores e o número de vezes que foi aplicado. GOES et al. (2008) verificaram que uma única aplicação de fungicida em flor aberta não controla a doença, indicando que o fungicida deve ser aplicado antes, como é demonstrado no trabalho de SILVA-JUNIOR (2014), no qual a mistura fungicida trifloxistrobina + tebuconazol, com três ou quatro pulverizações com início nos estágios fenológicos R1 (botões verdes cobertos pelas folhas) e R2 (botões verdes cobertos pelas sépalas), apresentou os melhores resultados para controle da doença.

**Tabela 10.** Incidência da doença causada por *Colletotrichum abscissum* em flores destacadas de lima ácida Tahiti tratadas preventivamente com óleos essenciais de tangerinas na dosagem de 32  $\mu\text{L mL}^{-1}$  junto ao fungicida comercial e testemunha negativa

	TRATAMENTO	INCIDÊNCIA DA DOENÇA (%)
IMATURA	Mexerica Late 585 IAC	94,44 a
	Tangerina IAC 2019Maria	88,25 a
	Tangor Murcott IAC 221	93,32 a
MADURA	Mexerica Late 585 IAC	84,78 a
	Tangerina IAC 2019Maria	88,71 a
	Tangor Murcott IAC 221	85,64 a
	Trifloxistrobina + tebuconazol	44,22 b
	Testemunha negativa	86,27 a

Médias seguidas da mesma letra minúscula na vertical não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. CV = 16,67%.



**Figura 24.** Sintomas de podridão floral dos citros causada por *Colletotrichum abscissum* em flores destacadas de lima ácida Tahiti, tratadas com óleo essencial de tangerinas e mantidas em meio Ágar-água dois dias após a inoculação.

### 5.6. Óleo essencial na indução de mecanismos de defesa em plantas de laranja Valência

Ao avaliar a atividade enzimática das plantas de laranja Valência, a aplicação dos tratamentos, tanto dos OEs, como do fungicida, não aumentaram a atividade das peroxidases (POX), polifenoloxidase (PPO) e fenilalanina amônia-liase (PAL), quando comparada com a testemunha não tratada (Tabela 11). Isso demonstra que os tratamentos não atuaram de forma indireta ativando os mecanismos de defesa das plantas e se prevenindo contra futuros ataques de patógenos. Esse resultado corrobora com o que foi observado no experimento com flores destacadas, no qual os OEs não conseguiram controlar a ação do patógeno quando aplicado preventivamente. No trabalho de Costa *et al.* (2019), não foi observada diferença significativa na atividade de peroxidases e polifenoloxidases entre folhas de feijão tratadas com OE de gengibre (*Zingiber officinale*) e não tratada, não evidenciando efeito sistêmico nessa cultura. Mesmo caso no trabalho de Porcino *et al.* (2023), ao testar diferentes OEs aplicados em frutos de tangerina Dancy, não constatou aumento na atividade de POX, PPO E PAL em relação a frutos sem aplicação de OE. Já em outros trabalhos como de SALTOS-REZABALA *et al.* (2022) o OE de tomilho (*Thymus vulgaris*) aplicado em plantas de tomate proporcionou um aumento na atividade da POX, PPO e em menor extensão da PAL.

Essa distinção de resultados pode estar relacionada ao modo em que a planta recebe esse sinal de alerta para dar início no seu sistema de defesa. Existem algumas moléculas químicas que são usadas para induzir o sistema de defesa em plantas, que são conhecidas como elicitores químicos. Nesse grupo se enquadra OEs e extrato de plantas que também pode ser usado para elicitação, como é o caso dos limonoides presentes no extrato da planta *Munronia henryi* considerados eficazes contra o vírus do mosaico do tabaco (Yan *et al.*, 2018). As moléculas do elicitador e do receptor são dois elementos fundamentais para o funcionamento da sinalização de defesa e do sistema imunológico. Essas moléculas são reconhecidas por receptores presentes dentro ou sobre a planta e ativam as vias de sinalização de defesa (Malik *et al.*, 2020) e podem variar com base em sua fonte, natureza e estrutura e são compostos de moléculas como lipídios, proteínas, peptídeos e oligossacarídeos (D'Ovidio *et al.*, 2004). Com isso, entende-se que dependendo da composição química do elicitador, o sinal que chega para os receptores da planta pode não ser reconhecido ou ser insuficiente para ativar os processos de defesa.

**Tabela 11.** Atividade das enzimas peroxidase, polifenoloxidase e fenilalanina amônia-liase em folhas de laranja Valência tratadas com óleos essenciais de tangerinas na dosagem de 32  $\mu\text{L mL}^{-1}$  junto ao fungicida comercial e testemunha negativa.

<b>ATIVIDADE ENZIMÁTICA</b>			
<b>TRAT</b>	<b>Peroxidase</b> ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ decomposto $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$ de massa fresca)	<b>Polifenoloxidase</b> ( $\mu\text{mol catecol}$ transformado $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$ de massa fresca)	<b>Fenilalanina amônia- liase</b> ( $\text{mmols min}^{-1} \text{g}^{-1}$ de massa fresca)
<b>T1</b>	0,0092 a	62,54 a	0,0024 a
<b>T2</b>	0,0104 a	64,94 a	0,0030 a
<b>T3</b>	0,0086 a	51,74 a	0,0031 a
<b>T4</b>	0,0118 a	72,25 a	0,0029 a
<b>T5</b>	0,0092 a	54,85 a	0,0031 a
<b>T6</b>	0,0100 a	61,59 a	0,0033 a
<b>T7</b>	0,0102 a	57,60 a	0,0031 a
<b>T8</b>	0,0134 a	63,04 a	0,0036 a

Médias seguidas da mesma letra minúscula na vertical não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade

## 6. CONCLUSÕES

- Quanto maior a espessura do epicarpo, maior o rendimento de óleo essencial tanto de frutos imaturos como maduros das tangerinas.
- O limoneno foi o principal composto encontrado nos óleos essenciais das tangerinas extraídos de frutos imaturos e maduros
- O maior rendimento de óleo essencial foi encontrado na mexerica Late IAC 585, extraído de frutos imaturos.
- O óleo essencial de frutos imaturos da mexerica Late IAC 585, utilizado na maior dosagem ( $32 \mu\text{L mL}^{-1}$ ), possui o melhor desempenho no controle *in vitro* de *C. abscissum*.
- O óleo essencial da tangerina IAC 2019Maria, na concentração de  $32 \mu\text{L mL}^{-1}$ , se sobressai no controle *in vitro* do fungo *C. abscissum*, quando extraído de frutos maduros.
- Quando utilizada as dosagens 16 e  $32 \mu\text{L mL}^{-1}$ , os óleos essenciais das três variedades de tangerinas extraídos de frutos imaturos e maduros, controlaram a germinação de esporos se igualando a ação do fungicida.
- Além dos OEs não terem ação sistêmica nas flores destacas para prevenir a infecção de *C. abscissum*, não apresentaram a capacidade de ativar os mecanismos de defesa da planta para também atuarem de maneira preventiva e indireta sobre o fungo.

## 7. LITERATURA CITADA

- ABDUL MALIK, Nurul Azmina; KUMAR, Ilakiya Sharanee; NADARAJAH, Kalaivani. Elicitor and receptor molecules: orchestrators of plant defense and immunity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 3, p. 963, 2020.
- AGOSTINI, J.P.; TIMMER, L.W. Dinâmica populacional e sobrevivência de cepas de *Colletotrichum gloeosporioides* em citros na Flórida. **Fitopatologia** 84:420-425. 1994
- AGOSTINI, Juan Pedro. Etiology and epidemiology of postbloom fruit drop of citrus. 1994.
- AHMAD, MUHAMMAD MUSHTAQ *et al.* Comparative physical examination of various citrus peel essential oils. **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 8, n. 2, p. 186-90, 2006.
- ALSARAF, Shahad *et al.* Chemical composition, in vitro antibacterial and antioxidant potential of Omani Thyme essential oil along with in silico studies of its major constituent. **Journal of King Saud University-Science**, v. 32, n. 1, p. 1021-1028, 2020.
- ANTUNES, Maria Dulce C.; CAVACO, Ana Margarida. O uso de óleos essenciais no controle da podridão pós-colheita. Uma revisão. **Revista Sabores e Fragrâncias**, v. 5, pág. 351-366, 2010.
- AQUINO, C. F. *et al.* Chemical composition and in vitro activity of three essential oils on *Colletotrichum gloeosporioides* from passion fruit. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, p. 329-336, 2014.
- ARAUJO, Fabio Fernando de; MENEZES, Danilo. Indução de resistência a doenças foliares em tomateiro por indutores biótico (*Bacillus subtilis*) e abiótico (Acibenzolar-S-Metil). **Summa phytopathologica**, v. 35, p. 169-172, 2009.
- ARAUJO, Leonardo; STADNIK, Marciel João. Cultivar-specific and ulvan-induced resistance of apple plants to *Glomerella* leaf spot are associated with enhanced activity of peroxidases. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 35, p. 287-293, 2013.
- BAKKALI, Fadil *et al.* Biological effects of essential oils—a review. **Food and chemical toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.
- BARROS, Fernanda Carvalho et al. Indução de resistência em plantas contra fitopatógenos. **Bioscience Journal**, v. 26, n. 2, p. 231-239, 2010.
- BASTIANEL, Marinês *et al.* Avaliação do banco de germoplasma de mexericas com relação às características físico-químicas e suscetibilidade à mancha marrom de alternária. **Bragantia**, v. 73, p. 23-31, 2014.
- BEBBER, Daniel P.; GURR, Sarah J. Crop-destroying fungal and oomycete pathogens challenge food security. **Fungal Genetics and Biology**, v. 74, p. 62-64, 2015.

- BEN-JABEUR, Maissa et al. Thyme essential oil as a defense inducer of tomato against gray mold and Fusarium wilt. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 94, p. 35-40, 2015.
- BIZZO, Humberto R.; HOVELL, Ana Maria C.; REZENDE, Claudia M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química nova**, v. 32, p. 588-594, 2009.
- BIZZO, Humberto R.; REZENDE, Claudia M. O mercado de óleos essenciais no Brasil e no mundo na última década. **Química Nova**, v. 45, p. 949-958, 2022.
- BONALDO, SOLANGE M.; PASCHOLATI, Sérgio Florentino; ROMEIRO, R. da S. Indução de resistência: noções básicas e perspectivas. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**, 2005.
- BOURGOU, Soumaya *et al.* Changes of peel essential oil composition of four Tunisian citrus during fruit maturation. **The Scientific World Journal**, v. 2012, 2012.
- BRAGANÇA, Carlos AD *et al.* Species of the *Colletotrichum acutatum* complex associated with anthracnose diseases of fruit in Brazil. **Fungal biology**, v. 120, n. 4, p. 547-561, 2016.
- BRAND, S. C. **Isolation and Identification of Substances from the Orange Tree “Valencia” (*Citrus sinensis*) Involved in the Stimulation and/or Break of Dormancy of Quiescent Structures of *Colletotrichum acutatum*, Causal Agent of Citrus Flower Rot.** 104f. 2012. Tese de Doutorado. School of Agriculture “Luiz de Queiroz”, University of São Paulo.
- BROWN, A. E. *et al.* Molecular characterization of slow-growing orange and key lime anthracnose strains of *Colletotrichum* from citrus as *C. acutatum*. **Phytopathology**, v. 86, n. 5, p. 523-527, 1996.
- BUSTAMANTE, Julen *et al.* Microwave assisted hydro-distillation of essential oils from wet citrus peel waste. **Journal of cleaner production**, v. 137, p. 598-605, 2016.
- CALO, Julianny Rivera *et al.* Essential oils as antimicrobials in food systems—A review. **Food control**, v. 54, p. 111-119, 2015.
- CAMPBELL, C. Lee; MADDEN, Laurence V. **Introduction to plant disease epidemiology**. 1990.
- CEBI, Nur; ERARSLAN, Azime. Determination of the Antifungal, Antibacterial Activity and Volatile Compound Composition of *Citrus bergamia* Peel Essential Oil. **Foods**, v. 12, n. 1, p. 203, 2023
- CHANDA, S. *et al.* Fruit and vegetable peels—strong natural source of antimicrobics. **Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology**, v. 1, p. 444-50, 2010.
- CHENG, Yu-Jung et al. Impacto da condição de armazenamento na composição química e atividade antifúngica do extrato de pomelo contra *Colletotrichum*

gloeosporioides e antracnose em manga pós-colheita. **Plants**, v. 11, n. 15, p. 2064, 2022.

CHOI, Hyang-Sook *et al.* Radical-scavenging activities of citrus essential oils and their components: detection using 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 48, n. 9, p. 4156-4161, 2000.

CHUTIA, M. *et al.* Antifungal activity and chemical composition of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against phytopathogens from North East India. **LWT-Food Science and Technology**, v. 42, n. 3, p. 777-780, 2009.

CITRUSBR. A cadeia do suco de laranja brasileiro. Position Paper Safra 2018/2019. Disponível em: [https://citrusbr.com/biblioteca/publicacoes-citrusbr/#dearflip-df\\_2381/1/](https://citrusbr.com/biblioteca/publicacoes-citrusbr/#dearflip-df_2381/1/). Acesso em: 9 dez. 2023

CONRATH, Uwe *et al.* Priming for enhanced defense. **Annual review of phytopathology**, v. 53, n. 1, p. 97-119, 2015.

COSTA, A. R. T. *et al.* Ação do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & LM Perry sobre as hifas de alguns fungos fitopatogênicos. **Revista brasileira de plantas medicinais**, v. 13, p. 240-245, 2011.

COSTA, Ana Paula *et al.* Extrato aquoso e óleo essencial de gengibre induzem mecanismos bioquímicos de defesa em feijoeiro. **Revista de Agricultura Neotropical**, v. 6, n. 2, p. 79-86, 2019.

COSTA, José GM *et al.* Avaliação da atividade anti-Trypanosoma e anti-Leishmania de *Mentha arvensis* e *Turnera ulmifolia*. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 11, n. 2, p. 147-153, 2012.

DALIO, Ronaldo JD *et al.* Tea tree oil induces systemic resistance against Fusarium wilt in banana and Xanthomonas infection in tomato plants. **Plants**, v. 9, n. 9, p. 1137, 2020.

DANTIGNY, Philippe; NANGUY, Sidjè Paule-Marina. Significado do estado fisiológico dos esporos dos fungos. **Revista Internacional de Microbiologia Alimentar**, v. 134, n. 1-2, pág. 16-20, 2009.

DE AZEVEDO, Plínio Tércio Medeiros *et al.* Efeito de misturas de óleos essenciais de espécies de citros no controle de *Colletotrichum gloeosporioides*. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 11, p. e85391110429-e85391110429, 2020.

DE GOES, A. *et al.* Evaluation of fungicide applications to sweet orange at different flowering stages for control of postbloom fruit drop caused by *Colletotrichum acutatum*. **Crop protection**, v. 27, n. 1, p. 71-76, 2008.

DE MACÊDO ANDRADE, Ana Cláudia *et al.* Atividade antifúngica, modo de ação, previsão de docking e efeitos antibiofilme dos enantiômeros (+) - $\beta$ -pineno contra *Candida* spp. **Tópicos atuais em química medicinal**, v. 18, n. 29, pág. 2481-2490, 2018.

- DE MENEZES FILHO, Antônio Carlos Pereira. Avaliação química e atividades antifúngica e antioxidante dos óleos essenciais dos frutos verdes e maduros de *Citrus limonia* Osbeck. (LIMÃO-CHINA). **Global Science and Technology**, v. 13, n. 3, p. 1-11, 2020.
- DE MORAIS, Lilia Aparecida Salgado. **Óleos essenciais no controle fitossanitário**. 2009.
- DE OLIVEIRA RAMALHO, Theresa Raquel *et al.* Gamma-terpinene modulates acute inflammatory response in mice. **Planta medica**, v. 81, n. 14, p. 1248-1254, 2015.
- DE SOUZA, Ruthe Lima; MESQUITA, Fabricio Rivelli; ALVES, William Ferreira. Avaliação da atividade antifúngica dos óleos essenciais de andiroba e copaíba e suas diferentes combinações no controle do fungo *Sclerotium rolfsii*. **Scientia Naturalis**, v.1, n.1, 2019.
- DE SOUZA, Wilza Carla Oliveira *et al.* Alternative control of Chalara paradoxa, causal agent of black rot of pineapple by plant extract of Mormodica charantia. **European Journal of Plant Pathology**, v. 142, p. 481-488, 2015.
- DEMARTELAERE, Andréa Celina Ferreira *et al.* Elicitors on the control of anthracnose and post-harvest quality in papaya fruits1. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 47, n. 2, p. 211-217, 2017.
- DENKOVA-KOSTOVA, Rositsa *et al.* Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of essential oils from tangerine (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.), lemon (*Citrus lemon* L.) and cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum* Blume). **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 76, n. 5-6, p. 175-185, 2021.
- DEVITE, Fernando Trevizan *et al.* Mandarin Essential Oils as an Alternative Method of Controlling the Fungus *Alternaria alternata* (Fr.: Fr.) Keissler. **Horticulturae**, v. 9, n. 6, p. 613, 2023.
- DIAS, A.L.B. *et al.* Composição química e efeitos inibitórios in vitro de óleos essenciais de cascas de frutas de três espécies de *Citrus* e limoneno no crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum*. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 80, p. 460-464, 2019.
- DIXON, Richard A.; LAMB, Christopher J. Molecular communication in interactions between plants and microbial pathogens. 1990.
- DIXON, Richard A.; PAIVA, Nancy L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. **The plant cell**, v. 7, n. 7, p. 1085, 1995.
- DONADIO, Luiz Carlos; STUCHI, Eduardo Sanches; CYRILLO, FL de L. **Tangerinas ou mandarinas**. Jaboticabal: Funep, 1998.
- D'OVIDIO, Renato *et al.* Polygalacturonases, polygalacturonase-inhibiting proteins and pectic oligomers in plant-pathogen interactions. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1696, n. 2, p. 237-244, 2004.

DUONG, Chau Trung *et al.* Application of Essential Oils Extracted from Peel Wastes of Four Orange Varieties to Control Anthracnose Caused by *Colletotrichum scovillei* and *Colletotrichum gloeosporioides* on Mangoes. **Plants**, v. 12, n. 15, p. 2761, 2023.

ELGAT, Wael AA Abo *et al.* *Eucalyptus camaldulensis*, *Citrus aurantium*, and *Citrus sinensis* Essential Oils as Antifungal Activity against *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, and *Fusarium culmorum*. **Processes**, v. 8, n. 8, p. 1003, 2020.

FAGAN, H. J. Postbloom fruit drop, a new disease of citrus associated with a form of *Colletotrichum gloeosporioides*. 1979.

FAO. 2021. **Citrus Fruit Statistical Compendium 2020**. Rome.

FEICHTENBERGER, E. *et al.* Doenças dos citros. **Manual de fitopatologia**, v. 2, p. 239-269, 2005.

FEICHTENBERGER, E. Queda dos frutos jovens de citros, doença induzida por uma raça virulenta do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 12, n. 2, p. 513-521, 1991

FENG, Gang *et al.* Fungicidal activities of camptothecin semisynthetic derivatives against *Colletotrichum gloeosporioides* in vitro and in mango fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 147, p. 139-147, 2019.

FERREIRA, Rafaela R. *et al.* Essential oils loaded-chitosan nanocapsules incorporation in biodegradable starch films: A strategy to improve fruits shelf life. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 188, p. 628-638, 2021.

FISHER, Katie; PHILLIPS, Carol A. The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* in vitro and in food systems. **Journal of applied microbiology**, v. 101, n. 6, p. 1232-1240, 2006.

FONTANA, Daniele Cristina *et al.* Using essential oils to control diseases in strawberries and peaches. **International Journal of Food Microbiology**, v. 338, p. 108980, 2021.

FORCELINI, Bruna B. *et al.* Resistance in strawberry isolates of *Colletotrichum acutatum* from Florida to quinone-oxidase inhibitor fungicides. **Plant Disease**, v. 100, n. 10, p. 2050-2056, 2016.

FUNDECITRUS – Fundo de Defesa da Citricultura. Inventário de árvores e estimativa da safra de laranja do cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo/Sudoeste Mineiro, 2019/20. Araraquara, **Fundecitrus**, p. 30, 2019.

GAMA, Andre B. *et al.* Sensitivity of *Colletotrichum acutatum* isolates from citrus to carbendazim, difenoconazole, tebuconazole, and trifloxystrobin. **Plant disease**, v. 104, n. 6, p. 1621-1628, 2020.

GIRARDI, E. A. *et al.* Guia de Reconhecimento dos Citros em Campo: Um Guia Prático Para o Reconhecimento em Campo de Variedades de Laranja-Doce e Outras Espécies de Citros Cultivadas No Estado de São Paulo e Triângulo Mineiro. Araraquara: **Fundecitrus**, 2021.

Global Citrus Oil Market: By Origin: Organic, Conventional; By Oil Type: Orange, Lemon, Lime, and Bergamot Oil, Others; By Application: Food and Beverage, Cosmetic and Personal Care, Pharmaceuticals, Others; Regional Analysis; Historical Market and Forecast (2018–2028); Competitive Landscape; Industry Events and Developments; 2022. Acesso em: 27 de setembro de 2024. Disponível online: <https://www.expertmarketresearch.com/reports/citrus-oil-market>

GONÇALVES, Fabrício Packer *et al.* Environmental requirements for infection of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* sensu lato in citrus flowers and prevalence of these pathogens in Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, v. 160, p. 27-37, 2021.

GOULIN, Eduardo Henrique *et al.* In vitro symptom induction of *Colletotrichum abscissum* infection in detached sweet orange flowers. **Journal of Plant Pathology**, v. 101, p. 695-699, 2019.

HAOKIP, Songthat William *et al.* Unraveling physicochemical profiles and bioactivities of citrus peel essential oils: a comprehensive review. **European Food Research and Technology**, v. 249, n. 11, p. 2821-2834, 2023.

Hitchen, A.; Brud, W. S.; In *Proceedings of the 50th International Symposium on Essential Oils*; Vienna, 2019.

HOSNI, Karim *et al.* Composition of peel essential oils from four selected Tunisian Citrus species: Evidence for the genotypic influence. **Food chemistry**, v. 123, n. 4, p. 1098-1104, 2010.

HOSSAIN, Farah *et al.* Evidence for synergistic activity of plant-derived essential oils against fungal pathogens of food. **Food microbiology**, v. 53, p. 24-30, 2016.

IBGE. Produção de laranja. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/laranja/sp>, acessado em 9 dez 2023.

ITC Trade Map, disponível em <https://www.trademap.org/Index.aspx>, acessada em março 2024.

JAHANI, Mahdi; PIRA, Masoumeh; AMINIFARD, Mohammad Hossein. Antifungal effects of essential oils against *Aspergillus niger* in vitro and in vivo on pomegranate (*Punica granatum*) fruits. **Scientia Horticulturae**, v. 264, p. 109188, 2020.

JAVED, Shabnam *et al.* Biocidal activity of citrus peel essential oils against some food spoilage bacteria. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 16, p. 3697-3701, 2011.

JIANG, Haiyang *et al.* Antifungal activity, mycotoxin inhibitory efficacy, and mode of action of hop essential oil nanoemulsion against *Fusarium graminearum*. **Food Chemistry**, v. 400, p. 134016, 2023.

JUNG, Ho Won et al. Priming in systemic plant immunity. **Science**, v. 324, n. 5923, p. 89-91, 2009.

KIRBAŞLAR, F. Gülay *et al.* Antimicrobial activity of Turkish citrus peel oils. **Pak. J. Bot**, v. 41, n. 6, p. 3207-3212, 2009.

KURABACHEW, Henok; WYDRA, Kerstin. Induction of systemic resistance and defense-related enzymes after elicitation of resistance by rhizobacteria and silicon application against *Ralstonia solanacearum* in tomato (*Solanum lycopersicum*). **Crop Protection**, v. 57, p. 1-7, 2014.

LAMBERT, R. J. W. *et al.* A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of applied microbiology**, v. 91, n. 3, p. 453-462, 2001.

LAMBERT, R. J. W. *et al.* A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of applied microbiology*, v. 91, n. 3, p. 453-462, 2001.

LI, Wei *et al.* Genes for hormone biosynthesis and regulation are highly expressed in citrus flowers infected with the fungus *Colletotrichum acutatum*, causal agent of postbloom fruit drop. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 128, n. 4, p. 578-583, 2003.

LI, Yan-Nan et al. Mechanisms underlying the inhibitory effects of linalool on *Aspergillus flavus* spore germination. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 106, n. 19, p. 6625-6640, 2022).

LIMA, Waléria Guerreiro *et al.* *Colletotrichum gloeosporioides*, a new causal agent of citrus post-bloom fruit drop. **European Journal of Plant Pathology**, v. 131, p. 157-165, 2011.

LIU, Hongxia et al. Postharvest BTH treatment induces resistance of peach (*Prunus persica* L. cv. Jiubao) fruit to infection by *Penicillium expansum* and enhances activity of fruit defense mechanisms. **Postharvest biology and technology**, v. 35, n. 3, p. 263-269, 2005.

LOMBARDO, Monia Federica *et al.* Assessing copper-alternative products for the control of pre-and postharvest citrus Anthracnose. **Plants**, v. 12, n. 4, p. 904, 2023.

Lopes, Daíse, *et al.* "Avaliação química dos óleos essenciais de exemplares de pimenta longa (*Piper hispidinervum* DC) do Estado do Acre." In: WORKSHOP DE ENCERRAMENTO DO PROJETO DE DESENVOLVIMENTO DE TECNOLOGIAS PARA PRODUÇÃO DE SAFROL A PARTIR DE PIMENTA LONGA (*Piper hispidinervum*), 2001.

LORENZETTI, Eloisa et al. Indução de resistência à *Macrophomina phaseolina* em soja tratada com extrato de alecrim. **Summa Phytopathologica**, v. 44, n. 1, p. 45-50, 2018.

- LUIZ, Caroline *et al.* Mechanisms of action of aloe polysaccharides and xanthan gum for control of black rot in cauliflower. **Scientia Horticulturae**, v. 200, p. 170-177, 2016.
- MARTUCCI, Josefa Fabiana *et al.* Oregano and lavender essential oils as antioxidant and antimicrobial additives of biogenic gelatin films. **Industrial Crops and products**, v. 71, p. 205-213, 2015.
- MATOS, Luana Ferreira *et al.* Chemical composition and insecticidal effect of essential oils from *Illicium verum* and *Eugenia caryophyllus* on *Callosobruchus maculatus* in cowpea. **Industrial Crops and Products**, v. 145, p. 112088, 2020.
- MAYER, Alfred M.; STAPLES, Richard C. Laccase: new functions for an old enzyme. **Phytochemistry**, v. 60, n. 6, p. 551-565, 2002.
- MCGOVERN, Robert J. *et al.* New report of *Colletotrichum gloeosporioides* causing postbloom fruit drop on citrus in Bermuda. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 34, n. 2, p. 187-194, 2012.
- MDIC, Comex Stat, disponível em <http://comexstat.mdic.gov.br/pt/home>, acessada em março 2024.
- MEHDIZADEH, Leila *et al.* Phytotoxicity and antifungal properties of the essential oil from the *Juniperus polycarpus* var. *turcomanica* (B. Fedtsch.) RP Adams leaves. **Physiology and molecular biology of plants**, v. 26, p. 759-771, 2020.
- MENG, Fan-Cheng *et al.* Turmeric: A review of its chemical composition, quality control, bioactivity, and pharmaceutical application. **Natural and artificial flavoring agents and food dyes**, p. 299-350, 2018.
- MILLEZI, A. F. *et al.* Caracterização e atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas condimentares e medicinais contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Revista brasileira de plantas medicinais**, v. 15, p. 373-379, 2013.
- MOHAMMADI, Mojtaba; KAZEMI, Homayoon. Changes in peroxidase and polyphenol oxidase activities in susceptible and resistant wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance. **Plant Science**, v. 162, n. 4, p. 491-498, 2002.
- MONTEIRO, Maria Beatriz de Oliveira; PEREIRA, Regina Paula Willemen; ABREU, Heber dos Santos. Bioquímica da lignificação de células xilemáticas. **Floresta e Ambiente**, v. 11, n. 2, p. 48-57, 2004.
- MORAES, Walkvria BC. Controle alternativo de fitopatógenos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 27, n. 13, p. 175-190, 1992.
- MOURA, Gabriela Silva *et al.* Efeito de óleos essenciais de Citrus spp. no controle pós-colheita da antracnose em banana e pimentão. **Revista Cultivando o Saber**, v. 10, n. 3, p. 73-87, 2017.
- NAZZARO, Filomena *et al.* Effect of essential oils on pathogenic bacteria. **Pharmaceuticals**, v. 6, n. 12, p. 1451-1474, 2013.

NAZZARO, Filomena *et al.* Essential oils and antifungal activity. **Pharmaceuticals**, v. 10, n. 4, p. 86, 2017.

NIKKHAH, Mehdi; HASHEMI, Maryam. Boosting antifungal effect of essential oils using combination approach as an efficient strategy to control postharvest spoilage and preserving the jujube fruit quality. **Postharvest Biology and Technology**, v. 164, p. 111159, 2020.

OLIVEIRA, J. *et al.* Antifungal activity of essential oils associated with carboxymethylcellulose against *Colletotrichum acutatum* in strawberries. **Scientia Horticulturae**, v. 243, p. 261-267, 2019.

OLIVEIRA, J. *et al.* Control of *Rhizopus stolonifer* in strawberries by the combination of essential oil with carboxymethylcellulose. **International journal of food microbiology**, v. 292, p. 150-158, 2019.

OLIVEIRA, M. D. M.; VARANDA, C. M. R.; FÉLIX, M. R. F. Induced resistance during the interaction pathogen x plant and the use of resistance inducers. **Phytochemistry letters**, v. 15, p. 152-158, 2016.

OUYANG, Qiuli *et al.* Synergistic activity of cinnamaldehyde and citronellal against green mold in citrus fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 162, p. 111095, 2020.

PASCHOLATI, Sergio Florentino; DALIO, Ronaldo José Durigan. Fisiologia do parasitismo: como as plantas se defendem dos patógenos. **Manual de Fitopatologia: Princípios e conceitos**, v. 1, 2018.

PASSARDI, Filippo *et al.* Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. **Plant cell reports**, v. 24, p. 255-265, 2005.

PATEL, Stuti; RAJPUT, Kiransinh; SARAF, Meenu. Elicitation of plant defense enzymes against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in tomato plant using a novel rhizobacteria *Providencia rettgeri* MSS2. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 12, p. 308-313, 2017.

PERES, N. A. *et al.* Lifestyles of *Colletotrichum acutatum*. **Plant disease**, v. 89, n. 8, p. 784-796, 2005.

PERINA, Fabiano José *et al.* Cinnamomun zeylanicum oil and trans-cinnamaldehyde against *Alternaria* brown spot in tangerine: direct effects and induced resistance. **Phytoparasitica**, v. 47, n. 4, p. 575-589, 2019.

PIATI, Andréia *et al.* Efeito in vitro do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* em *Penicillium* sp. 2011. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 3, p. 1033-1040, 2011.

Pinho, D. B. *et al.* *Colletotrichum abscissum* Pinho & OL Pereira, sp. novembro. **Personônia**, 34, 236–237. 2015

PIRES, Tamara Cubiaki; PICCOLI, Roberta Hilsdorf. Efeito inibitório de óleos essenciais do gênero *Citrus* sobre o crescimento de micro-organismos. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n. 2, p. 378-385, 2012.

PORCINO, Mirelly M. et al. Essential oils in the management of *Alternaria alternata* f. sp. citri in 'Dancy'tangerine fruits. **Revista Caatinga**, v. 36, p. 291-299, 2023.

PURKAIT, S. et al. Synergistic antibacterial, antifungal and antioxidant efficacy of cinnamon and clove essential oils in combination. **Archives of microbiology**, v. 202, p. 1439-1448, 2020.

QI, Xiaoxi et al. Mechanisms of antifungal and mycotoxin inhibitory properties of *Thymus vulgaris* L. essential oil and their major chemical constituents in emulsion-based delivery system. **Industrial Crops and Products**, v. 197, p. 116575, 2023.

RAMALHO, Theresa R. et al. Gamma-terpinene modulation of LPS-stimulated macrophages is dependent on the PGE2/IL-10 axis. **Planta Medica**, p. 1341-1345, 2016.

RASPO, Matías Alejandro et al. Antioxidant and antimicrobial activities of citrus essential oils from Argentina and the United States. **Food bioscience**, v. 36, p. 100651, 2020.

RÍOS, José-Luis. Essential oils: What they are and how the terms are used and defined. In: **Essential oils in food preservation, flavor and safety**. Academic Press, 2016. p. 3-10.

SALEEM, Muhammed; SAEED, Mohammed Tariq. Potential application of waste fruit peels (orange, yellow lemon and banana) as wide range natural antimicrobial agent. **Journal of King Saud University-Science**, v. 32, n. 1, p. 805-810, 2020.

SALTOS-REZABALA, Luis Alberto et al. Thyme essential oil reduces disease severity and induces resistance Against *Alternaria linariae* in tomato plants. **Horticulturae**, v. 8, n. 10, p. 919, 2022.

SALVO FILHO, A. Podridão floral. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 15, n. 1, p. 135-142, 1994.

SCHWAN-ESTRADA, Kátia Regina Freitas; STANGARLIN, JOSÉ RENATO; CRUZ, ME da S. Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos. **Floresta**, v. 30, n. 1-2, p. 129-137, 2000.

Shahbandeh M. World Production of Citrus Fruits in 2020, by Region (in Thousand Metric Tons) 2022. Acesso em: 27 de setembro de 2024. Disponível online: <https://www.statista.com/statistics/264002/production-of-citrus-fruits-worldwide-by-region/>

SHAN, Yang. Comprehensive utilization of citrus by-products. **Academic Press**, 2016.

SHARMA, Abhishek et al. Antifungal activities of selected essential oils against *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici 1322, with emphasis on *Syzygium aromaticum* essential oil. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 123, n. 3, p. 308-313, 2017.

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

SILVA JUNIOR, Geraldo José da. **Manual de podridão floral: medidas essenciais de controle**. 2019.

SILVA JUNIOR, Geraldo José da. **Podridão floral dos citros: dinâmicas temporal e espacial, sensibilidade de *Colletotrichum acutatum* a fungicidas e controle da doença**. 2011. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

SILVA, A. O. *et al.* Identification of *Colletotrichum* species associated with postbloom fruit drop in Brazil through GAPDH sequencing analysis and multiplex PCR. **European Journal of Plant Pathology**, v. 147, p. 731-748, 2017.

SILVA-JUNIOR, G. J. *et al.* Spatiotemporal characterization of citrus postbloom fruit drop in Brazil and its relationship to pathogen dispersal. **Plant pathology**, v. 63, n. 3, p. 519-529, 2014.

SILVA-JUNIOR, Geraldo José et al. Eficácia e época de aplicação de fungicidas para controle da podridão pós-floração dos citros. *Crop Protection*, v. 59, p. 51-56, 2014.)

SILVESTRES, W. P.; PAULETTI, G. Óleo essencial cítrico: produção, composição e fracionamento. **Citricultura do Rio Grande do Sul: indicações técnicas. Secretaria da Agricultura, Pecuária e Irrigação-SEAPI**, 2018.

SIMMONDS, J. H. A study of the species of *Colletotrichum* causing ripe fruit rots in Queensland. **Queensland Journal of Agricultural and Animal Sciences**, v. 22, n. 4, p. 437-459, 1965.

SMIGIELSKI, K. *et al.* Biological properties and chemical composition of essential oils from flowers and aerial parts of lavender (*Lavandula angustifolia*). **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 21, n. 5, p. 1303-1314, 2018.

SPADA, L. Danos causados pela podridão floral dos citros em diferentes variedades de laranja doce. 28 f. Dissertação de Mestrado. Araraquara, SP: Fundo de Defesa da Citricultura. 2011

STANGARLIN, J. R. *et al.* Plantas medicinais e o controle alternativo de doenças de plantas. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, Brasília**, v. 11, p. 16-21, 1999.

STANGARLIN, José R. *et al.* A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 10, n. 1, p. 18-18, 2011.

SULZBACH, Manuela *et al.* Characterization of green mandarin peel essential oil extracted by laboratory and industrial methods. **DELOS: DESARROLLO LOCAL SOSTENIBLE**, v. 16, n. 44, p. 1185-1202, 2023.

SUTTON, B. C. *et al.* The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. **The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*.**, p. 1-26, 1992.

SWAMY, Mallappa Kumara; AKHTAR, Mohd Sayeed; SINNI AH, Uma Rani. Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: an updated review. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, n. 1, p. 3012462, 2016.

SWINGLE, W.T. The botany of citrus and its wild relations. **The Citrus Industry**, v. 1, p. 190-422, 1967.

TAHVILIAN, Reza *et al.* Ethnomedicinal plants: Study on antifungal activity of essential oil of *Pistacia khinjuk* (combined with the dominance  $\gamma$ -Terpinene) against *Candida albicans*. **International journal of pharmaceutical and clinical research**, v. 8, n. 10, p. 1369-1373, 2016.

TAIZ, Lincoln *et al.* **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. Artmed Editora, 2017.

TANG, Cailin *et al.* Exploring the antibacterial mechanism of essential oils by membrane permeability, apoptosis and biofilm formation combination with proteomics analysis against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 310, n. 5, p. 151435, 2020.

TANG, Cailin *et al.* Exploring the antibacterial mechanism of essential oils by membrane permeability, apoptosis and biofilm formation combination with proteomics analysis against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 310, n. 5, p. 151435, 2020.

TEIXEIRA, João Paulo Feijão; MARQUES, Márcia Ortiz Mayo; PIO, Rose Mary. Caracterização dos óleos essenciais em frutos de nove genótipos de tangerina. **Citrus Research & Technology**, v. 35, n. 1, p. 1-10, 2017.

THIPYAPONG, Piyada; HUNT, Michelle D.; STEFFENS, John C. Antisense downregulation of polyphenol oxidase results in enhanced disease susceptibility. **Planta**, v. 220, p. 105-117, 2004.

TIMMER, L. W. *et al.* Postbloom fruit drop, an increasingly prevalent disease of citrus in the Americas. 1994.

TIMMER, L. W. Postbloom fruit drop of citrus – symptom disease cycle and control. **Proceedings of Florida State Horticultural Society**, Tallahassee, v. 106, p.102-105, 1993.

TIMMER, L.W., ZITKO, S.E. Early season indicators of postbloom fruit drop of citrus and the relationship of disease and fruit production. **Plant Disease**, St. Paul, v. 79, n. 10, p. 1017-1020, 1995.

TRAN, Lan T.; TAYLOR, John S.; CONSTABEL, C. Peter. The polyphenol oxidase gene family in land plants: Lineage-specific duplication and expansion. **BMC genomics**, v. 13, p. 1-12, 2012.

ULTEE, A. *et al.* Antimicrobial activity of carvacrol toward *Bacillus cereus* on rice. *Journal of food protection*, v. 63, n. 5, p. 620-624, 2000.

VAN LOON, L. C.; VAN STRIEN, E. A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological and molecular plant pathology**, v. 55, n. 2, p. 85-97, 1999.

VIUDA-MARTOS, M. *et al.* Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. **Food control**, v. 19, n. 12, p. 1130-1138, 2008.

VOO, S. S. *et al.* Assessing the Biosynthetic Capabilities of Secretory Glands in Citrus Peel. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 159, p. 81-94, 2012

WACULICZ-ANDRADE, C. E. *et al.* *Colletotrichum gloeosporioides sensu stricto*: an endophytic species or citrus pathogen in Brazil? **Australasian Plant Pathology**, v. 46, p. 191-203, 2017.

YAN, Ying *et al.* Munronin O, a potential activator for plant resistance. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 146, p. 13-18, 2018.

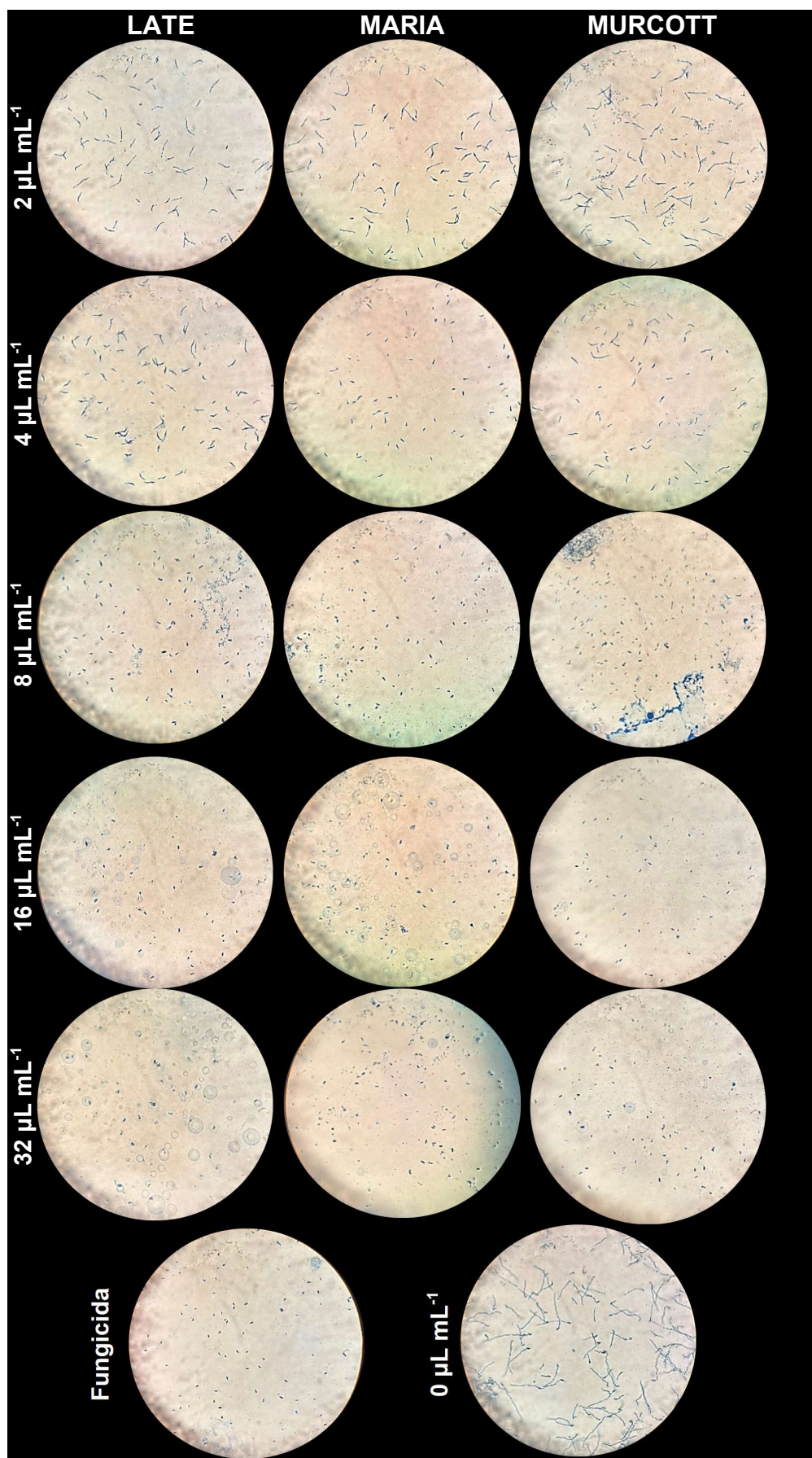
YAO, H.; TIAN, S. Effects of pre and post-harvest application of salicylic acid or methyl jasmonate on inducing disease resistance of sweet cherry fruit in storage. *Postharvest Biology and Technology*, v.35, p.253-262, 2005.

YI, F.; JIN, R.; SUN, J.; MA, B.; BAO, X. Evaluation of mechanical-pressed essential oil from Nanfeng mandarin (*Citrus reticulata* Blanco cv. Kinokuni) as a food preservative based on antimicrobial and antioxidant activities. *LWT – Food Science and Technology*, v. 95, p 346-353, 2018.

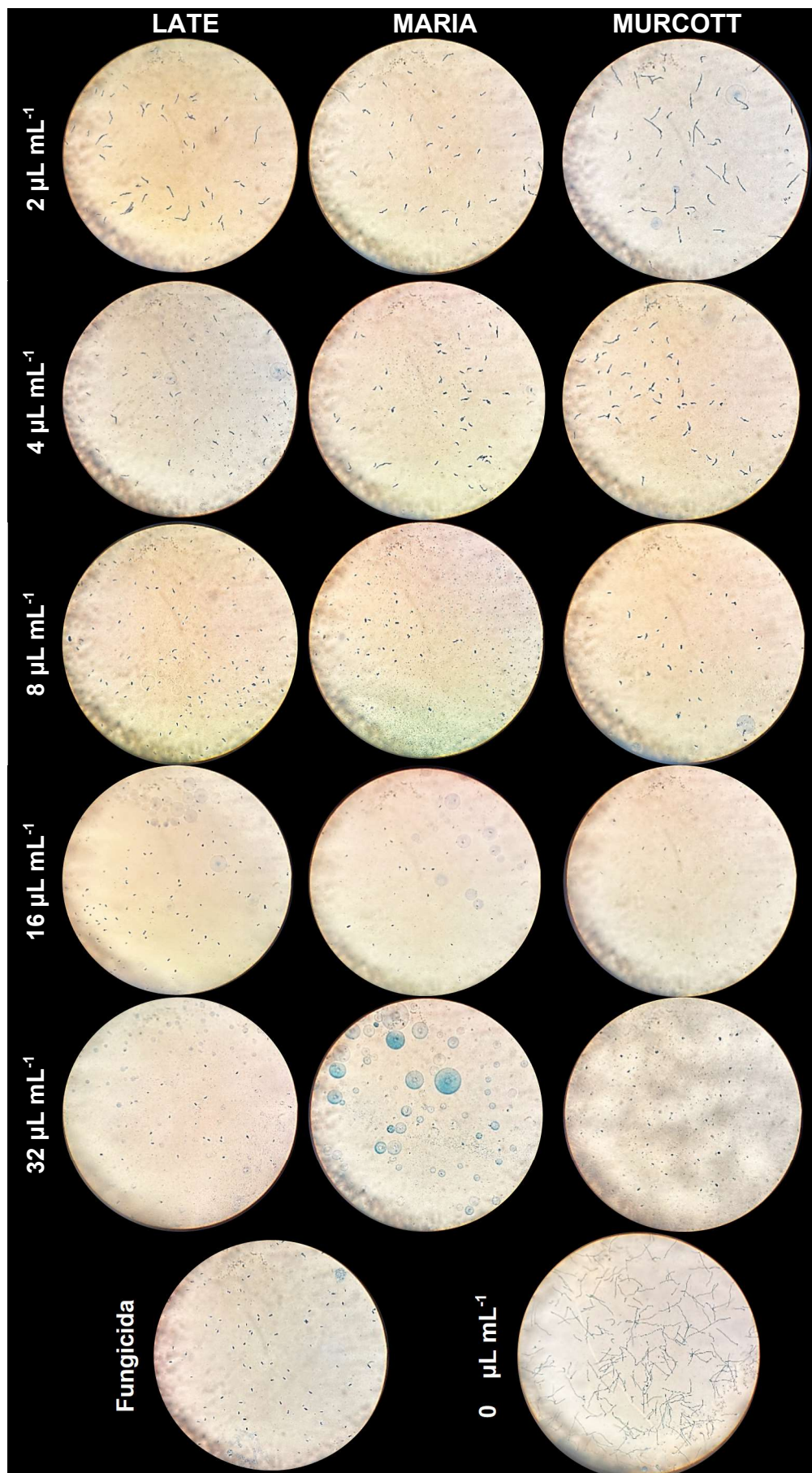
ZHANG, Xiaofeng *et al.* In vitro evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of *Melaleuca alternifolia* essential oil. **BioMed research international**, v. 2018, 2018.

ZULFIQAR, Muhammed; BRLANSKY, R. H.; TIMMER, L. W. Infection of flower and vegetative tissues of citrus by *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides*. **Mycologia**, v. 88, n. 1, p. 121-128, 1996.

## APÊNDICE



**Apêndice 1.** Esporos germinados de *Colletotrichum abscisssum* em diferentes doses (0, 2, 4, 8, 16 e 32  $\mu\text{L mL}^{-1}$ ) de óleo essencial de casca de três variedades de tangerinas extraídos de frutos imaturo, junto ao fungicida comercial (trifloxistrobina ( $100 \text{ g L}^{-1}$ ) + tebuconazol ( $200 \text{ g L}^{-1}$ )).



**Apêndice 2.** Esporos germinados de *Colletotrichum abscisssum* em diferentes doses (0, 2, 4, 8, 16 e 32  $\mu\text{L mL}^{-1}$ ) de óleo essencial de casca de três variedades de tangerinas extraídos de frutos maduros, junto ao fungicida comercial (trifloxistrobina ( $100 \text{ g L}^{-1}$ ) + tebuconazol ( $200 \text{ g L}^{-1}$ )).