



**USO DE PRODUTOS NATURAIS NA PÓS-COLHEITA DE CITROS PARA CONTROLE DE
*Geotrichum candidum***

Larissa **Peressim**¹; Willian N. **Duarte**²; Mariana Nadjara **Klein**³; Katia Cristina **Kupper**⁴

Nº 14148

RESUMO - Não obstante a importância econômica e social que representa a citricultura para o Brasil, este setor enfrenta vários problemas de natureza fitossanitária. Dentre tais problemas, destacam-se as doenças de pós-colheita, que normalmente são iniciadas no campo e irão se desenvolver durante a colheita, transporte, embalagem e armazenamento dos frutos. Dentre tais doenças, a podridão azeda, causada pelo fungo *Geotrichum candidum*, é responsável por grandes perdas de frutos cítricos em fase de comercialização, sendo muitas vezes um fator limitante na produção. O controle das doenças que ocorrem em pós-colheita de citros é feito normalmente por produtos químicos, porém, para esta doença, em particular, não existem produtos registrados que sejam eficientes. Diante do exposto, este trabalho teve por objetivo avaliar a eficiência de produtos naturais como quitosana e extrato pirolenhoso no controle da podridão azeda. Os resultados obtidos nos ensaios *in vitro* mostraram que todas as concentrações de quitosana testadas inibiram 100% o crescimento micelial e a germinação dos conídios de *G. candidum*. Nos testes *in vivo* constatou-se que, os produtos naturais testados quitosana e extrato pirolenhoso, combinados ou não, apresentam potencial para controle da podridão azeda, quando aplicados de forma curativa sobre frutos cítricos.

Palavras-chaves: Podridão Azeda; Quitosana; Extrato Pirolenhoso.

1 Autor, Bolsista CNPq (PIBITI): Graduação em Engenharia Agrônoma, UFSCar, Araras-SP; lariperessim@hotmail.com.

2 Colaborador, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Agroecologia, UFSCar, Araras-SP.

3 Colaborador, Aluna de Doutorado, FCAV, UNESP, Jaboticabal-SP

4 Orientadora: Pesquisadora, Centro de Citricultura Sylvio Moreira/IAC, Cordeirópolis-SP; katia@centrodecitricultura.br.



ABSTRACT - Despite the economic and social importance which represents the citrus industry for the Brazil, this sector faces several phytosanitary problems. Among such problems, there are the post-harvest diseases, which are usually initiated in the field and they will develop during harvest, transport, packaging and storage of fruits. Among such diseases, sour rot, caused by the fungus *Geotrichum candidum*, is responsible for large losses of citrus fruits in the commercial phase, often a limiting factor in the production. The control of diseases that occur in post-harvest citrus is by chemicals, however, for this disease, in particular, there are no registered products that are efficient. Given the above, this study aimed to evaluate the efficacy of natural products such as chitosan and pyroligneous acid in the control of sour rot. The results obtained from *in vitro* assays showed that all the chitosan concentrations tested inhibited 100% the mycelial growth and the spore germination of *G. candidum*. In *in vivo* assays it was found that natural products tested chitosan and pyroligneous acid, combined or not, have potential for control of sour rot when applied curatively on citrus fruits..

Key-words: Sour rot; Chitosan; Pyroligneous acid.

1 INTRODUÇÃO

Dada à importância econômica e social que a citricultura representa para o país, e em particular, para o Estado de São Paulo, o setor enfrenta vários problemas com doenças que ocorrem na fase de pós-colheita, dentre essas, destaca-se a podridão azeda, causada por *Endomyces geotrichum* (anamorfo *Geotrichum candidum*). Tal patógeno diminui a qualidade e a quantidade de frutos de citros, bem como prejudicam os valores nutricionais e de mercado.

A doença é relatada em todos os países produtores, afetando todas as espécies e cultivares de citros (TALIBI et al., 2011). No entanto, nenhuma das medidas de controle utilizadas para podridões de pós-colheita em citros são eficazes contra *G. candidum*, uma vez que esse patógeno não é controlado por nenhum fungicida registrado e usado no beneficiamento de frutos na pós-colheita de citros (LIU et al., 2009). Ortofenilfenato de sódio (OPP) é o único agroquímico capaz de reduzir parcialmente a podridão azeda (FENG et al., 2011; LIU et al., 2009), no entanto, em relatos prévios, tal composto pode ser cancerígeno (KITAGAWA & KAWADA, 1984), podendo, portanto, causar problemas relacionados à saúde pública.



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014 12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

Considerando que não há registro de produtos químicos, aliado ao fato da demanda da sociedade por produtos orgânicos e isentos de resíduos (DUFFY et al., 2003; ZHU et al., 2006; KINAY et al., 2007) e os problemas relacionados à saúde pública, tem-se tornado imprescindível a busca de alternativas de controle dessa doença.

A quitosana é um polissacarídeo de alta massa molecular, solúvel em ácidos orgânicos, é comestível, segura para os seres humanos (BAUTISTA-BANÕS et al., 2006), e oferece um promissor e versátil polímero biodegradável para embalagens de alimentos (DUTTRA et al., 2007). Esse produto natural tem se mostrado efetivo para o controle de doenças devido à capacidade para formar filmes protetores, similares às ceras empregadas no revestimento de frutas e, assim, atuar na regulação das trocas de gases e de umidade entre produto e o ambiente, além da possibilidade de induzir respostas de resistência nos tecidos vegetais (EL GHAOUTH et al., 1992). Segundo Terry & Joyce (2003), estes efeitos têm sido atribuídos à sua atividade direta antifúngica, ao efeito da modificação atmosférica e/ou a indução na pós-colheita de respostas de resistência em tecidos vegetais. De acordo com Romanazzi et al. (2013), o uso de quitosana tem apresentado efeito positivo deste no controle de doenças de pós-colheita em morangos, como mofo cinzento, podridão mole e mofo azul, causadas pelos fungos *Botrytis cinerea*, *Rhizopus stolonifer* e *Penicillium spp.*, respectivamente.

Produtos a base de extrato vegetal têm se apresentado, também, como uma alternativa de controle promissora ao uso de produtos químicos. No processo da carbonização da madeira, obtém-se, como produto principal, o carvão vegetal. Os gases liberados neste processo, normalmente são desperdiçados na atmosfera, constituindo-se em poluente. Com a condensação e recuperação desses gases voláteis obtém-se, além do carvão vegetal, o extrato pirolenhoso (líquido, ácido, licor pirolenhoso ou vinagre da madeira) e alcatrão (Portoet al., 2007).

A utilização do extrato pirolenhoso (EP) na agricultura foi introduzida recentemente no Brasil, constituindo-se em um produto promissor. Porém, ainda são escassas as informações científicas quanto à sua eficiência no solo, nas plantas e no combate às pragas, bem como, as concentrações ideais a serem utilizadas. Os trabalhos desenvolvidos por Miyazaka et al. (2000), Zanetti et al. (2003) e Alves (2006) vêm contribuir com informações importantes quanto à utilização do extrato pirolenhoso.

Diante do exposto, este trabalho teve por objetivo avaliar a eficiência de produtos naturais como quitosana e extrato pirolenhoso no controle da podridão azeda, causada pelo fungo *Geotrichum candidum*.



2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Efeito de quitosana, em diferentes concentrações, na germinação de *Geotrichum candidum*.

Para este ensaio, foi utilizado quitosana com baixo peso molecular e grau de desacetilação de 75-85% (Sigma-Aldrich Co.). Diferentes concentrações do produto foram obtidas por meio da diluição deste em água destilada com adição de ácido acético glacial a 10% do volume em pH corrigido para 5,6, de acordo com a metodologia descrita por Jiang & Li (2001).

Para determinação do efeito de quitosana na germinação de *G. candidum*, gotas de 10µL do produto, nas concentrações de 0; 0,05; 0,10; 0,15; 0,20 e 0,25%, juntamente com 10µL da suspensão de esporos do patógeno, contendo 1×10^5 conídios/mL, foram depositadas em áreas demarcadas de lâmina, previamente preparadas, com meio ágar-ágar. Para o tratamento testemunha foram colocadas gotas de água destilada e esterilizadas no lugar do produto (Kupper et al., 2009). As culturas foram incubadas em estufa para B.OD, no escuro a 25°C por 14 horas. Ao término desse período, foi realizada a avaliação, através da contagem de esporos germinados e não germinados, em um total de 100 conídios, efetuando-se o cálculo da porcentagem de germinação. Foi considerado germinado o conídio cujo tamanho do tubo germinativo fosse maior ou igual à largura do conídio. Utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado, sendo cada tratamento composto por 5 repetições.

2.2 Efeito de quitosana, em diferentes concentrações, no crescimento micelial de *Geotrichum candidum*.

Para determinação do efeito de quitosana no crescimento micelial de *G. candidum*, o produto foi adicionado ao meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) nas seguintes concentrações: 0; 0,05; 0,10; 0,15; 0,20; 0,25; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0% (KUPPER et al., 2009). Como testemunhas foram utilizadas os meios contendo BDA mais água nas respectivas concentrações, no lugar do produto. Após os meios terem sido vertidos para as placas de Petri, discos de 5mm de diâmetro, obtidos de colônias ativas do fitopatógeno, foram transferidos para o centro das placas, justapondo-se a face contendo a colônia diretamente sobre o meio de cultura. A incubação das culturas se deu em estufa para B.O.D a 25°C \pm 1°C e fotoperíodo 12/12h. A avaliação se deu por meio da medição do diâmetro da colônia do fungo em dois sentidos perpendiculares, após sete



dias de incubação das culturas. Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, com cinco repetições e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

2.3 Avaliação in vivo de diferentes concentrações de quitosana e extrato pirolenhoso (com ou sem adição de cera) no controle de *Geotrichum candidum*.

Para realização deste estudo foi utilizado isolado de *G. candidum* pertencente à coleção de microrganismos do Laboratório de Fitopatologia e Controle Biológico do Centro de Citricultura “Sylvio Moreira”/IAC-Cordeirópolis/SP.

Frutos de laranja lima foram esterilizados superficialmente com hipoclorito de sódio a 0,7% e, feridos em dois pontos equidistantes, na região equatorial dos frutos, com agulhas esterilizadas a uma profundidade de 0,3mm. Em seguida, os frutos foram inoculados com o fitopatógeno na concentração de 1×10^5 conídios/mL, 24 horas antes e 24 horas depois da realização dos tratamentos. Os ensaios corresponderam aos seguintes tratamentos: (A) quitosana 0,25%, (B) quitosana 0,5%, (C) extrato pirolenhoso 15%, (D) extrato pirolenhoso 20%, (E) cera 18% (F) químico (G) quitosana 0,25% + extrato pirolenhoso 15%, (H) quitosana 0,25% + extrato pirolenhoso 20%, (I) quitosana 0,5% + extrato pirolenhoso 15%, (J) quitosana 0,5% + extrato pirolenhoso 20%, (K) cera 18% + extrato pirolenhoso 15% e (L) cera 18% + extrato pirolenhoso 20%.

Para a realização do experimento, os frutos foram pulverizados, nos dois pontos feridos, de acordo com os respectivos tratamentos, ou em água destilada para os tratamentos testemunhas e, finalmente, armazenados em condições ambientes (27°C e 70% de UR).

Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado, sendo cada tratamento composto de 3 repetições com 20 frutos por repetição. a avaliação correspondeu à determinação da porcentagem de frutos doentes. Os dados foram analisados por análise de variância (anova) e as médias foram comparadas pelo teste de tukey a 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Efeito de quitosana, em diferentes concentrações, na germinação e no crescimento micelial de *geotrichum candidum*.

Todas as concentrações de quitosana testadas inibiram 100% o crescimento micelial e a germinação dos conídios de *G. candidum*. Os resultados apresentados neste trabalho estão de acordo com outros autores, que também relataram que o produto afetou a germinação e o



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014
12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

crescimento micelial de vários fitopatógenos, como *Colletotrichum gloeosporioides*, *Botrytis cinerea*, e *Guignardia citricarpa* (BAUTISTA-BAÑOS et al., 2003; CAMILI et al., 2007; RAPUSSI et al., 2009).

3.2 Avaliação *in vivo* de diferentes concentrações de quitosana e extrato pirolenhoso (com ou sem adição de cera) no controle de *G. candidum*.

Os ensaios de controle *in vivo* (Tabela 1) mostraram que os produtos naturais (quitosana e/ou extrato pirolenhoso) não tiveram efeito positivo para o controle da podridão azeda, quando os frutos de laranja Lima foram tratados preventivamente.

No entanto, quando os frutos foram tratados de forma curativa, ou seja, após a inoculação com o patógeno, verificou-se que, os tratamentos que envolveram cera (18% SST) não foram efetivos para o controle da doença. Por outro lado, todos os tratamentos a base de produtos naturais, combinados ou não, controlaram a podridão azeda e, não diferiram, significativamente, do produto químico (Imazalil).

Tabela 1. Porcentagem de frutos de laranja Lima doentes, após tratamento com diferentes concentrações de quitosana e extrato pirolenhoso (com ou sem adição de cera), 24 horas antes e 24 horas após a inoculação com *Geotrichum candidum*.

TRATAMENTOS ⁽¹⁾	% FRUTOS DOENTES	
	PREVENTIVO	CURATIVO
Frutos inoculados e não tratados	14,33 ab ⁽²⁾	14,33 ab
Cera 18% + E.P 15%	16,67 ab	16,33 a
Cera 18% + E.P 20%	18,00 a	14,66 a
Cera 18%	17,66 a	11,00 ab
Químico (Imazalil)	4,00 c	3,33 c
Quitosana 0,25% + E.P 20%	14,66 ab	6,00 bc
Quitosana 0,25% + E.P 15%	9,66 bc	4,00 c
Quitosana 0,5% + E.P 20%	17,66 a	3,33 c
Quitosana 0,25% + E.P 15%	19,00 a	3,66 c
Extrato Pirolenhoso 20%	12,33 ab	6,00 bc
Extrato Pirolenhoso 15%	17,33 a	4,00 c
Quitosana 0,5%	13,00 ab	5,33 bc
Quitosana 0,25%	14,33 ab	3,66 c

⁽¹⁾ E.P = Extrato Pirolenhoso; ⁽²⁾ Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (Tukey, P \geq 0,05).



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014 12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

4 CONCLUSÃO

Os produtos naturais testados quitosana e extrato pirolenhoso, combinados ou não, apresentam potencial para controle da podridão azeda, quando aplicados de forma curativa.

5 AGRADECIMENTOS

À orientadora do projeto, Prof^a. Dra. Katia Cristina Kupper, pela oportunidade e também ao CNPq pela bolsa concedida.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, M. Impacto da utilização de fino de carvão e extrato pirolenhoso na agricultura. 2006. 43f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal.

BAUTISTA-BANOS, S. et al. Effects of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose levels and quality of papaya fruit. *Crop Protection*, v.22, p.1087–1092, 2003.

BAUTISTA-BANÑOS, S.; HERNANDEZ-LAUZARDO, A. N; VELAZQUEZ-DEL VALLE, M. G.; HERNÁNDEZ-LOPEZ, M.; BARKA, E.A.; BOSQUEZ-MOLINA, E.; WILSON, C. L. Chitosan as a potencial natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. *Crop Protection*, v. 25, n. 2, p. 108-118, 2006.

CAMILI, E. C.; BENATO, E. A.; PASCHOLATI, S. F.; CIA, P. Avaliação de quitosana, aplicada em pós-colheita, na proteção de uva ‘Itália’ contra *Botrytis cinerea*. *Summa Phytopathologica*, v.33, p.215-221, 2007.

DUFFY, B.; SCHOUTEN, A.; RAAIJMAKERS, J.M. Pathogen self-defense: mechanisms to counteract microbial antagonism. *Annual Review of Phytopathology*, 41: 501-38, 2003.

DUTTA, P. K.; TRIPATHI, S.; MEHROTRA, G. K.; DUTTA, J. Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. *Food Chemistry*, v. 114, p. 1173-1182, 2007.

EL GHAOUTH, A.; PONNAMPALAM, R.; CASTAIGNE, F.; ARUL, J. Chitosan coating to extend the storage life of tomatoes. *HortScience*, v. 27, n. 9, p. 1016-1018, 1992.

FENG, L.; WU, F.; LI, J.; JIANG, Y.; DUAN, X. Antifungal activities of polyhexamethylenebiguanide and polyhexamethyleneguanide against the citrus sour rot pathogen *Geotrichum citri-aurantii* *in vitro* and *in vivo*. *Postharvest Biology and Technology*, 61, 160–164, 2011.

JIANG, Y.M.; LI, Y.B. Effects of chitosan coating on postharvest life and quality of longan fruit. *Food Chemistry*, v. 73, n. 1, p. 139-143, 2001.

KINAY, P.; MANSOUR, M. F.; GABLER, F. M.; MARGOSAN, D. A.; SMILANICK, J. L. Characterization of fungicide-resistant isolates of *Penicillium digitatum* collected in California. *Crop Protection*, 26, n. 4, p. 647-656, 2007.

KITAGAWA, H.; KAWADA, K. Effect of sorbic acid and potassium sorbate on the control of sour rot of citrus fruits. *Proc. Florida State Hort. Soc.* v.97, p.133-135, 1984.



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014
12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

- KUPPER, K. C.; BELLOTTE, J. A. M.; GOES, A. Controle Alternativo de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 31, p. 1004-1015, 2009.
- LIU, X.; WANG, L.P.; LI, Y.C.; LI, H.Y.; YU, T.; ZHENG, X.D. Antifungal activity of thyme oil against *Geotrichum citri-aurantii* in vitro and in vivo. *J. Appl. Microbiol.* 107: 1450–1456, 2009.
- MIYASAKA, S. et al. Técnicas de produção e uso de fino de carvão e licor pirolenhoso. In: ENCONTRO DE PROCESSOS DE PROTEÇÃO DE PLANTAS – CONTROLE ECOLÓGICO DE PRAGAS E DOENÇAS, 1., 2001, Botucatu. Resumos... Botucatu; AgroEcológica, p.161-176, 2001.
- PORTO, P.R.; SAKITA, A.E.N; SAKITA, M.N. Efeito da aplicação do extrato pirolenhoso na germinação e no desenvolvimento de mudas de *Pinus elliottii* var. *elliottii*. *IF Sér. Reg.*, São Paulo, n. 31, p. 15-19, 2007.
- RAPPUSSI, M. C. C. et al. Chitosan Reduces Infection by *Guignardia citricarpa* in Postharvest. *Braz. Arch. Biol. Technol., Brazil*, v.52, p. 513-521, 2009.
- ROMANAZZI, G.; FELIZIANI, E.; SANTINI, M. LANDI, L. Effectiveness of postharvest treatment with chitosan and other resistance inducers in the control of storage decay of strawberry. *Postharvest Biology and Technology*, v. 75, p. 24-27, 2013.
- TALIBI, I.; ASKARNE, L.; BOUBAKER, H.; BOUDYACH, E.H.; AOUMAR, A. A. B. *In vitro* and *in vivo* antifungal activities of organic and inorganic salts against citrus sour rot agent *Geotrichum candidum*. *Plant Pathology Journal*, p. 1-8, 2011.
- TERRY, L.A.; JOYCE, D. C. Elicitors of induced diseases resistance in postharvest horticultural crops: a brief review. *Postharvest Biology and Technology*, v. 32, p. 113, 2003.
- ZANETTI, M.; CAZETTA, J.O.; MATTOS JÚNIOR, D.; CARVALHO, S.A. Uso de subprodutos de carvão vegetal na formação do porta-enxerto limoeiro cravo em ambiente protegido. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 25, p. 1-8, 2003.
- ZHU, J.; XIE, Q.; LI, H. Occurrence of imazalil-resistant biotype of *Penicillium digitatum* in China and the resistant molecular mechanism. *Journal of Zhejiang University SCIENCE A*, Zhejiang, v.7 (Suppl. II), p. 362-365, 2006.